

**Internalisierung von *Streptococcus pyogenes* in humane
Endothelzellen: Charakterisierung der beteiligten
Signaltransduktionswege**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Andreas Nerlich
aus Meißen

1. Referent: apl. Professor Dr. Gursharan Singh Chhatwal

2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 31. 07. 2006

mündliche Prüfung (Disputation) am: 29. 11. 2006

Druckjahr 2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Talay, S. R., Petermann, N., Nerlich, A., Chhatwal, G. S. and Rohde M.: Endothelial Cell Invasion of Tissue Invasive Streptococci. (Vortrag) VAAM Jahrestagung, Braunschweig (2004).

Nerlich, A., Talay, S. R., Petermann, N., Chhatwal, G. S. and Rohde M.: Endothelial Cell Invasion of Tissue Invasive Streptococci. (Poster) 16. Lancefield Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Australien (2005).

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 <i>Streptococcus pyogenes</i> - Gruppe A Streptokokken	3
2.1.1 Virulenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i>	4
2.1.1.1 Adhärenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i>	5
2.1.1.2 Weitere Virulenzfaktoren von <i>S. pyogenes</i>	7
2.2 Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen	8
2.2.1 Lipid Rafts	9
2.2.2 Die Src-Kinase-Familie	10
2.2.3 Rho GTPasen	11
2.2.3.1 Rho GTPasen - Moleküle mit Schalterfunktion	11
2.2.3.2 Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch GTPasen	12
2.2.4 Phospholipide und PI3-Kinase	13
2.2.4.1 PI3-Kinase-Klassen	13
2.2.4.2 Effektoren der PI3-Kinasen	15
2.3 Durch <i>S. pyogenes</i> aktivierte Signaltransduktionswege in eukaryontischen Zellen	16
2.4 Ziele dieser Arbeit	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Verwendete Materialien	19
3.2 Verwendete Bakterienstämme	19
3.3 Antikörper	20
3.4 Mikrobiologische Methoden	21
3.4.1 Medien für die Kultivierung der Bakterien	21
3.4.2 Kultivierung und Stammhaltung	21
3.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Streptokokken	21

3.5	Molekularbiologische Methoden	22
3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	22
3.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.5.3	Photometrische Quantifizierung von DNA	22
3.6	Zellbiologische Methoden	23
3.6.1	Säurereinigung von Deckgläsern	23
3.6.2	Beschichtung von Zellkulturgefäßen	23
3.6.3	Standardzellkultur	23
3.6.3.1	HUVEC	23
3.6.3.2	SYF und SYF + c-Src	23
3.6.4	Subkultivierung von eukaryontischen Zellen	24
3.6.5	Transfektion von HUVEC	24
3.6.6	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren	25
3.6.7	Infektion von HUVEC mit GAS	25
3.6.7.1	Infektion nach Standard-Protokoll	25
3.6.7.2	Synchronisierte Infektion	26
3.6.8	Infektion von SYF- und SYF + c-Src-Fibroblasten mit GAS	26
3.6.9	Herstellung von Zelllysaten	27
3.7	Biochemische Methoden	28
3.7.1	Aktivierung von Na_3VO_4	28
3.7.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
3.7.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford	28
3.7.2.2	Messung der Optischen Dichte (OD)	28
3.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
3.7.4	Färbung von Proteinen in PA-Gelen	30
3.7.5	Western Blot	30
3.7.5.1	Transfer von Proteinen	30
3.7.5.2	Färbung von Proteinen auf Membranen	31
3.7.5.3	Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	31
3.7.6	Aufreinigung polyklonaler Antikörper	32
3.7.7	Bestimmung der Rac1-Aktivität	33
3.7.7.1	Überexpression von GST und GST-CRIB	33
3.7.7.2	Infektion von HUVEC mit <i>S. pyogenes</i> A128	33
3.7.7.3	Präzipitation von aktivem Rac1	34
3.7.7.4	Nachweis von Rac1 im Western Blot	34
3.8	Elektronenmikroskopie	35
3.9	Digitale Fluoreszenzmikroskopie	35

3.9.1	Epifluoreszenzmikroskopie	36
3.9.2	Konfokale Mikroskopie	36
3.9.3	Digitale Bildverarbeitung	37
3.9.4	Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen	38
3.9.4.1	Differentielle Fluoreszenzfärbung von Streptokokken . . .	39
3.9.4.2	Fluoreszenzfärbung von Streptokokken und Zellkomponenten	40
3.9.4.3	Quantifizierung des phagolysosomalen LAMP1-Erwerbs .	41
3.10	Statistische Auswertung	41

4 Ergebnisse 42

4.1	Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 in HUVEC	42
4.1.1	Bildung von Membranprotrusionen	42
4.1.2	Akkumulation von Aktin und α -Actinin	43
4.1.3	Entwicklung eines synchronisierten Infektionsprotokolls	45
4.2	<i>Lipid rafts</i> sind an der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 beteiligt	47
4.2.1	Die Cholesterin-Depletierung hemmt die Internalisierung	47
4.2.2	Rekrutierung von <i>lipid raft</i> -Markern zur Internalisierungsstelle . . .	48
4.2.3	Caveolae sind am Internalisierungsprozess nicht beteiligt	49
4.3	Die Funktion von Protein-Tyrosinkinasen während der Internalisierung von GAS A128	51
4.3.1	Die Aktivität von Protein-Tyrosinkinasen des Wirtes ist essentiell für die Internalisierung	51
4.3.2	Die Src-Kinase wird während der Internalisierung aktiviert	53
4.3.3	Die Hemmung der Src-Kinase verhindert die Bildung der Membranausstülpungen und die Akkumulation von Aktin	54
4.3.4	Src-Kinase-defiziente Zellen sind resistent gegen GAS A128	56
4.4	Die Aktivierung von Rac1 ist essentiell für die Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128	58
4.4.1	Rac1 wird zur Internalisierungsstelle rekrutiert	58
4.4.2	Funktionales Rac1 ist für die Internalisierung essentiell	59
4.4.3	Rac1 wird während der Internalisierung aktiviert	60
4.4.4	GAS A128 kolokalisiert mit Aktin und GFP-Rac1	62
4.4.5	Die Aktinpolymerisation wird durch Arp2/3 initiiert	63
4.5	Die Funktion von PI3-Kinasen bei der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128	65
4.5.1	Die Internalisierung benötigt keine aktiven PI3Ks	65
4.5.2	Rac1 wird auch in der Gegenwart des PI3K-Inhibitors aktiviert . . .	66

4.5.3	<i>S. pyogenes</i> A128 kolokalisiert mit dem endosomalen Marker EEA1 .	68
4.5.4	Modulation des intrazellulären Schicksals von <i>S. pyogenes</i> in der Gegenwart von PI3K-Inhibitoren	70
5	Diskussion	72
6	Literaturverzeichnis	85
7	Abkürzungsverzeichnis	102
8	Danksagung	106

Abbildungsverzeichnis

2.1	Der Rho GTPase-Zyklus	11
2.2	Biochemische Aktivitäten der PI3-Kinasen	14
4.1	Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 in HUVEC	42
4.2	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128	43
4.3	Lokalisation von <i>S. pyogenes</i> A128 mit Aktin und α -Actinin	44
4.4	Synchronisierung der Infektion mit <i>S. pyogenes</i> A128	45
4.5	Quantitative Analyse der <i>S. pyogenes</i> A128-Internalisierung nach Methyl- β -Cyclodextrin Behandlung von HUVEC	47
4.6	Lokalisation von <i>S. pyogenes</i> A128 mit <i>lipid raft</i> -Markern	48
4.7	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A40 und A128	50
4.8	Effekt des Tyrosinkinase-Inhibitors Genistein auf die Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 und Lokalisation mit Aktin und Phosphotyrosin	51
4.9	Effekt des Src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 und Lokalisation mit Aktin und Src-Kinase	52
4.10	Phosphorylierung der Src-Kinase in <i>S. pyogenes</i> A128-infizierten HUVEC	53
4.11	Effekt des Src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die Bildung von Membranprotrusionen während der Aufnahme von <i>S. pyogenes</i> A128	54
4.12	Effekt des Src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die Akkumulation von Aktin in der Umgebung von <i>S. pyogenes</i> A128	55
4.13	Expression von c-Src in SYF-Fibroblasten	56
4.14	Quantifizierung der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 in Src-defiziente Zellen	56
4.15	Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 in SYF und SYF + c-Src Zellen	57
4.16	Lokalisation von <i>S. pyogenes</i> A128 und GFP-Rac1	58

4.17	Quantifizierung der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 in wtRac1- und N17Rac1-exprimierende Zellen	59
4.18	Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128 in wtRac1- und N17Rac1-exprimierende Zellen	59
4.19	Bestimmung der Rac1-Aktivität durch Präzipitation mit GST-CRIB	60
4.20	Aktivierung von Rac1 durch <i>S. pyogenes</i> A128 in HUVEC	61
4.21	Lokalisation von <i>S. pyogenes</i> A128 mit GFP-Rac1 und Aktin	63
4.22	Lokalisation von <i>S. pyogenes</i> A128 mit dem Arp2/3-Komplex	64
4.23	Effekt des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Internalisierung von GAS A40 und A128	66
4.24	Aktivierung von PI3K und Rac1 in <i>S. pyogenes</i> A128-infizierten HUVEC in der Gegenwart von LY294002	67
4.25	Akkumulation von Aktin in <i>S. pyogenes</i> A128-infizierten HUVEC in der Gegenwart von LY294002	68
4.26	Lokalisation von <i>S. pyogenes</i> A128 und EEA1	69
4.27	Quantitative Analyse der PI3K-abhängigen Fusion von <i>S. pyogenes</i> A128 mit LAMP1-positiven Lysosomen in HUVEC	70
4.28	Phagolysosomaler Erwerb von LAMP1 in Abhängigkeit der PI3K-Aktivität	71
5.1	Modell der Signaltransduktionsvorgänge während der Internalisierung von <i>S. pyogenes</i> A128	82
5.2	Endosomale Fusionsereignisse während der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3	83

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete <i>S. pyogenes</i> -Stämme	19
3.2	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	19
3.3	Verwendete Primärantikörper	20
3.4	Verwendete Sekundärantikörper	20
3.5	Eingesetzte Inhibitoren und deren Konzentration	25
3.6	Verwendete Filtersätze in der Epifluoreszenzmikroskopie	36
4.1	Aktin-Akkumulationsereignisse während der synchronisierten Infektion mit GAS A128	46
4.2	Densitometrische Analyse der Rac1-Aktivierung	62

1 Zusammenfassung

S. pyogenes ist ein wichtiger humanpathogener Erreger, der sowohl lokale Infektionen als auch schwere invasive Erkrankungen verursachen kann. Während die Interaktionen von Streptokokken mit Zellen des Epithels schon genauer untersucht worden sind, gibt es bisher kaum Daten über die Wechselwirkungen mit dem Endothelium. Das Endothelium kleidet die Blutgefäße aus und stellt somit ein relevantes Ziel für invasive Streptokokken oder deren Toxine dar. In dieser Arbeit wurden die eukaryontischen Signaltransduktionskaskaden, die an der Aufnahme eines *S. pyogenes*-Stammes des M3-Typs in humane Endothelzellen beteiligt sind, auf molekularer Ebene charakterisiert.

In dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass Streptokokken des Serotyps M3 über cholesterinreiche Membranmikrodomänen in Endothelzellen aufgenommen werden können. Bei diesen Mikrodomänen handelt es sich nicht um Caveolae. Dieses Ergebnis grenzt diesen Internalisierungsmechanismus deutlich von der Fibronektin/Integrin-vermittelten Aufnahme ab. Die Internalisierung geht ultrastrukturell mit der Bildung von protrusiven Membranausstülpungen einher, die sich über die Bakterien schieben. Auf molekularer Ebene kommt es zu Reorganisationen des Aktin-Zytoskeletts. Es konnte durch pharmakologische Inhibition sowie mikroskopische und biochemische Untersuchungen gezeigt werden, dass für diese Reorganisationen die Aktivität von Kinasen der Src-Familie essentiell ist. Eine weitere wichtige Klasse von zellulären Regulatoren, die bei diesen Prozessen beteiligt sind, stellen die GTPasen der Rho-Familie dar. Insbesondere Rac1 spielt bei den in dieser Arbeit untersuchten Prozessen eine entscheidende Rolle. Dies wurde durch Kollokalisationsexperimente, transiente Transfektion mit der dominant negativen Form von Rac1 und der biochemischen Bestimmung der Rac1-Aktivität gezeigt. Darüber hinaus konnte das erste Mal eine Verbindung zwischen der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts während der Aufnahme von Streptokokken und der Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes, der durch Rac1 aktiviert werden kann, nachgewiesen werden. Die Aktivierung von Rac1 erfolgt dabei auf einem Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-unabhängigen Weg, der bisher für die Internalisierung von Streptokokken nicht beschrieben wurde. Während die Internalisierung der Bakterien und die damit einhergehende Aktivierung von Rac1 unabhängig von der Aktivität von PI3Ks ablaufen, spielen diese jedoch eine entscheidende Rolle für das weitere intrazelluläre Schicksal der Streptokokken.

Die Bakterien kolokalisieren transient mit EEA1, einem Marker für frühe Endosomen, der über eine FYVE-Domäne an Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PtdIns(3)*P*) binden kann. PtdIns(3)*P* ist ein Produkt von Klasse III PI3Ks und wird durch die Kinase transient auf der endosomalen Membran gebildet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch pharmakologische Inhibierung der PI3Ks der Erwerb des Proteins LAMP1, das ein Marker für späte Endosomen/Lysosomen ist, verhindert werden konnte. Diese Experimente zeigten das erste Mal eine Funktion dieser PI3K-Klasse bei der Internalisierung von *S. pyogenes* in eukaryontische Zellen.

2 Einleitung

2.1 *Streptococcus pyogenes* - Gruppe A Streptokokken

Streptococcus pyogenes (Gruppe A Streptokokken, GAS) ist ein wichtiger Gram-positiver, humanpathogener Erreger, der sowohl lokale als auch schwere invasive Erkrankungen verursachen kann. *S. pyogenes* gehört zur Gruppe der homofermentativen Bakterien, die ihre Energie durch Fermentation von Glucose zu Lactat beziehen. Des Weiteren sind Streptokokken aerotolerant und katalasenegativ sowie unbeweglich. Sie bilden keine Sporen. Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die Fähigkeit zur Hämolyse, d. h. Erythrozyten zu lysieren. Dies äußert sich in der Bildung klarer Höfe um wachsende Kolonien auf Blutagarplatten, was auch als β -Hämolyse bezeichnet wird. Aufgrund dieser β -Hämolyse lässt sich *S. pyogenes* eindeutig von anderen Streptokokken-Spezies unterscheiden, die wie zum Beispiel *Streptococcus pneumoniae* nur zur unvollständigen Hämolyse, der sog. α - oder vergrünenden Hämolyse fähig sind.

S. pyogenes ist ein ausschließlich humanpathogener Erreger. Als Reservoir gelten sowohl die menschliche Haut als auch die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes. Streptokokken sind in der Lage, eine ganze Reihe von verschiedenen Krankheiten zu verursachen, die von lokalen Infekten der Haut (Impetigo und Hautläsionen) und der Schleimhäute (Tonsillitis, Pharyngitis, Scharlach) [38] bis zu schweren, invasiven und lebensbedrohenden Krankheiten wie Sepsis, dem sog. *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) und nekrotisierender Fasciitis reichen können [44]. Als Folge von Streptokokkeninfektionen können Autoimmunerkrankungen wie rheumatisches Fieber, rheumatische Endokarditis und akute Glomerulonephritis auftreten [38, 158]. Diese Folgeerkrankungen stellen insbesondere in Entwicklungsländern ein großes Problem dar. Gegenwärtig treten etwa 10 Millionen Streptokokkeninfektionen pro Jahr auf, bei denen es sich in den meisten Fällen um lokale Infektionen (Haut- und Racheninfektionen) handelt. Trotzdem kommt es seit Mitte der 80iger Jahre immer wieder zu weltweit auftretenden Fällen von schweren systemischen Streptokokkeninfektionen und Ausbrüchen von STSS [10, 19, 161]. Diese Fälle, insbesondere das STSS, sind mit einer hohen Mortalitätsrate von 30-60% verbunden, da es für diese Erkrankungen keine wirkungsvolle Therapie gibt [157]. In Entwicklungsländern ist rheumatisches Fieber eine der Hauptursachen für herzkreislaufbedingte Todesfälle. Von

100.000 Kindern im Schulalter sind jährlich 100-200 von dieser durch Streptokokken hervorgerufen Folgeerkrankung betroffen [118].

Hinsichtlich der Behandlung von Streptokokkeninfektionen ist Penicillin immer noch das Antibiotikum der Wahl und überraschender Weise wurden bis heute keine resistenten Stämme gefunden [68, 96, 24]. Trotzdem kommt es in bis zu 25% der mit Penicillin behandelten Pharyngitisfälle zu einer unvollständigen Beseitigung des Erregers, was darauf zurückzuführen ist, dass Streptokokken Strategien entwickelt haben, um der Wirkung des Antibiotikums zu entgehen [77, 127]. Als mögliche Erklärungsansätze wurden zum einen das intrazelluläre Überleben der Bakterien als auch die Degradation des Antibiotikums durch β -Lactamase produzierende Kommensale, die den Wirt zusammen mit dem Pathogen besiedeln, vorgeschlagen [130, 148].

Einer der initialen und essentiellen Schritte in der Pathogenese stellt die Adhäsion an das Gewebe des Wirtes dar. Die Adhäsion ermöglicht es pathogenen Bakterien, sich an bestimmten Stellen im Körper des Wirtes anzuheften und diesen nachfolgend zu kolonisieren [11]. Ausgehend von der Anheftung können die Streptokokken entweder extrazellulär verbleiben und sich lokal vermehren oder sich in tiefere Gewebeschichten ausbreiten. Darüber hinaus können sie auch ihre eigene Aufnahme in Wirtszellen auslösen. In dieser intrazellulären Nische sind sie vor Antibiotika, die die Zellmembran nicht durchdringen können, und der Immunabwehr des Wirtes geschützt, können persistieren und sich zu einem späteren Zeitpunkt weiter ausbreiten. *S. pyogenes* hat eine ganze Reihe von Virulenzfaktoren evolviert, die es dem Bakterium ermöglichen, den Wirt zu kolonisieren, in tiefere Gewebe und Zellen einzudringen und das Immunsystem zu umgehen.

2.1.1 Virulenzfaktoren von *S. pyogenes*

Nachdem das Bakterium mit dem Wirt in Kontakt gekommen ist, gibt es mehrere kritische Schritte für das Pathogen um eine Infektion auszulösen. Der erste Schritt der Kolonisierung besteht in der Anheftung an das Wirtsgewebe, der durch bakterielle Adhäsine, die die Bindung an das Epithelium der Schleimhäute und der Haut vermitteln, eingeleitet wird. Gleichzeitig muss *S. pyogenes* die Immunabwehr des Wirtes umgehen, d. h. (i) die Möglichkeiten besitzen, die Aufnahme durch phagozytische Zellen zu verhindern, (ii) innerhalb von phagozytischen Zellen zu überleben und (iii) in der Lage sein, Antikörper zu degradieren. Alle diese Prozesse werden von verschiedenen Virulenzfaktoren übernommen, die das Bakterium zu einer erfolgreichen Kolonisierung des Wirtes befähigen und sein Überleben ermöglichen.

2.1.1.1 Adhärenzfaktoren von *S. pyogenes*

Als Adhärenzfaktoren oder Adhäsine bezeichnet man bakterielle Oberflächenkomponenten, die die Anheftung an das Gewebe des Wirtes ermöglichen. Bei den meisten Adhäsinen von *S. pyogenes* handelt es sich um Proteine, wobei auch andere Faktoren wie Polysaccharide oder Lipide adhäsive Funktionen ausüben können. Die Zielstrukturen dieser bakteriellen Adhäsine sind Moleküle auf mukosalen Oberflächen, der Haut und in Wunden. Die meisten pathogenen Bakterien exprimieren mehrere Adhäsine, die entweder dieselben aber auch unterschiedliche Zielmoleküle binden können. Die Fähigkeit unterschiedliche Adhäsine exprimieren zu können, lässt auf eine Beteiligung der einzelnen Adhäsine während verschiedener Phasen des Adhärenzvorganges, auf eine umweltbedingt unterschiedliche Expression und/oder eine redundante Funktion schließen.

S. pyogenes besitzt mindestens neun distinkte fibronektinbindende Proteine. Einige von ihnen sind in einer großen Zahl von verschiedenen Serotypen zu finden wie bspw. die Proteine SfbI oder FBP54, während das M1 oder das M3 Protein ausschließlich in den Serotypen M1 oder M3 zu finden sind. SfbI bzw. seine allelische Variante Protein F1 sind unter den fibronektinbindenden Proteinen die am besten charakterisiertesten. Talay *et al.* konnten 1992 die Funktion von SfbI/Protein F1 als Adhäsine nachweisen [163, 63]. SfbI hat eine modulare Struktur und bindet Fibronektin über zwei verschiedene Domänen [164, 149, 122]. Durch Bindung der Fibrin-Heparin-Bindungsregion des Fibronektins an die C-terminale Fibronektin-Binderegion kommt es zu einer Konformationsänderung im SfbI-Protein. Diese aktiviert die sog. *spacer* 2-Region (auch UR-Domäne genannt), die nun ihrerseits an das 45-kDa-Fragment des Fibronektins bindet [165]. Neben der Funktion als Adhäsine stellt SfbI auch ein potentes Invasin dar, das die Aufnahme in eukaryontische Zellen vermitteln kann [104, 74]. Die Bindung an humane Zellen ist abhängig von fibronektinbindenden Integrinen auf der Zelloberfläche [123]. Vor kurzem wurde die erste dreidimensionale Struktur für ein bakterielles fibronektinbindendes Peptid, das B3T-Peptid aus dem FnB Protein (FnBP) von *Streptococcus dysgalactiae*, im Komplex mit den ¹F1²F2-Modulen des Fibronektins veröffentlicht [147]. Dabei wurden Bindungsaffinitäten im nanomolaren Bereich gemessen. Diese hohe Bindungsaffinität ist eine wichtige Voraussetzung für die bakterielle Adhäsion, die den Scherkräften auf den mukosalen Oberflächen standhalten muss.

Protein F2 oder PFBP sind homologe aber unterschiedliche fibronektinbindende Proteine, die in den meisten Isolaten gefunden werden, denen das Gen für *sfbI/prtF1* fehlt [75, 137]. Wie SfbI besitzt Protein F2 zwei Bindungsdomänen, die mit Fibronektin interagieren können.

Ein weiteres Protein, das Fibronektin binden kann, ist das Protein FBP54. Es ist das am häufigsten vorkommende fibronektinbindende Protein und in allen *S. pyogenes* Isolaten

zu finden [33]. Obwohl FBP54 das klassische Membrananker-Motiv von Gram-positiven Oberflächenmolekülen fehlt, wird es vermutlich durch einen alternativen Mechanismus auf der Oberfläche der Bakterien verankert [27].

Cue *et al.* [36] konnten zeigen, dass M1 Protein, ein Mitglied der M Proteinfamilie (siehe auch Kapitel 2.1.1.2), in der Lage ist, Fibronectin zu binden. Durch Anti-M1 Antikörper konnte die Adhärenz an Epithelzellen blockiert werden, des Weiteren zeigte eine M1-defiziente Mutante eine verringerte Adhärenz und Invasion [43]. Die zellulären Rezeptoren des M1/Fibronectin-Komplexes sind, wie auch im Falle von SfbI, die $\alpha_5\beta_1$ -Integrine [37].

Neben den fibronectinbindenden Faktoren sind zur Zeit zwei kollagenbindende Proteine von *S. pyogenes* beschrieben: M3 Protein und Cpa. M3 Protein bindet lösliches Kollagen des Typs I und IV, sowie native Kollagenmatrices [42]. Verantwortlich für die Bindung ist die N-terminale, variable Region, die jedoch spezifisch für das M3 Protein ist. Dies erklärt auch die Tatsache, warum andere M Proteine nicht in der Lage sind, Kollagen zu binden. Neben der direkten Bindung an die Kollagenmatrix führt die Aggregation von löslichem Kollagen auf der Bakterienoberfläche zur Bildung von großen bakteriellen Aggregaten [42]. Das zweite bisher beschriebene Kollagen-Bindungsprotein wurde in einem Stamm des Serotyps 49 gefunden und vermittelt die Anheftung an immobilisiertes Kollagen Typ I [131]. In stark bekapselten Stämmen des Serotyps M18 wird die Kollagen-Bindungsaktivität durch die Hyaluronsäurekapsel (siehe Kapitel 2.1.1.2) vermittelt. Die Fähigkeit zur Kollagenbindung durch M3 Protein und die Hyaluronsäurekapsel wurde sowohl *ex vivo* auf nativen Kollagenfasern als auch *in vivo* in einem murinen Hautinfektionsmodell nachgewiesen [42].

Neben der Interaktion mit Kollagen ist die Hyaluronsäurekapsel auch in der Lage, direkt an das humane CD44 Protein auf der Oberfläche von Keratinozyten zu binden, welche den Hauptzelltyp des humanen Rachenepithels und der Haut darstellen [144].

Ein weiterer Rezeptor auf der Oberfläche von Keratinozyten, der in diesem Fall durch das M6 Protein gebunden wird, ist CD46 [116]. Verantwortlich für die Interaktion ist der C-terminale Teil des M6 Proteins und die kurzen Konsensusdomänen drei und vier von CD46 [59]. Obwohl strukturell eng miteinander verwandt, repräsentieren die M Proteine hinsichtlich ihrer zellulären Rezeptoren eine heterogene Gruppe von Adhäsinen [13].

Einige der genannten Adhäsine stellen auch potente Invasine dar, die es *S. pyogenes* ermöglichen, die eigene Aufnahme in Wirtszellen auszulösen. Die diesen Invasionsvorgängen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden in Kapitel 2.3 eingehender diskutiert.

2.1.1.2 Weitere Virulenzfaktoren von *S. pyogenes*

Neben den für die Adhärenz wichtigen Virulenzfaktoren besitzt *S. pyogenes* noch eine Vielzahl weiterer Faktoren, die für die erfolgreiche Ausbreitung und die Umgehung der Immunabwehr des Wirtes essentiell sind und von denen im Folgenden einige näher beschrieben werden sollen.

Antiphagozytische Faktoren ermöglichen es den Streptokokken zum Beispiel im menschlichen Blut zu überleben, indem sie die Aufnahme und Abtötung durch Immunzellen wie polymorphkernige Leukozyten (PMN) und Makrophagen verhindern. Die Hyaluronsäurekapsel ist ein auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiertes Polysaccharid, welches sich aus wiederholenden Einheiten von D-Glukuronsäure und N-Acetylglukosamin zusammensetzt [159]. Der Verlust der Kapsel durch Mutationen oder enzymatischen Abbau erhöht die Empfindlichkeit gegen Phagozytose sowohl *in vitro* [41, 52] als auch *in vivo* [9, 72, 102, 179, 180]. Außerdem vermittelt die Kapsel auch die Bindung von Kollagen und die Adhärenz an den humanen Hyaluronsäurerezeptor CD44 (siehe auch Kapitel 2.1.1.1) [42, 39].

Ein weiterer Virulenzfaktor, der eine antiphagozytische Funktion besitzt, ist das M Protein, das auch für die Einteilung der Streptokokken in unterschiedliche Serotypen benutzt wird [86]. Der antiphagozytische Effekt des M Proteins wird von einigen Gruppen auf der Fähigkeit Fibrinogen und den Komplementfaktor H zu binden zurückgeführt, was zu einer Hemmung der Komplementkaskade führt [69]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass verschiedene M Proteine einen Beitrag zur Adhäsion und Internalisierung leisten. Da das M Protein verantwortlich für die Generierung von protektiven Antikörpern gegen Streptokokken ist [15], wird versucht einen Impfstoff auf der Basis dieses Proteins zu entwickeln [40].

S. pyogenes ist in der Lage, die Rekrutierung von PMNs zum Infektionsherd zu reduzieren, indem durch die Serinprotease ScpA (auch bekannt als C5a-Peptidase) der chemotaktischen Komplementfaktor C5a gespalten wird. Aufgrund ihres hohen Konservierungsgrades, der Lokalisation auf der Oberfläche der Bakterien und ihrer wichtigen Rolle während der Infektion, stellt die C5a-Peptidase ebenfalls einen möglichen Impfstoffkandidaten gegen Gruppe A Streptokokken dar [152, 29]. Protein SIC (*streptococcal inhibitor of complement*) ist ein sekretiertes Protein, das vorrangig in Streptokokken des Serotyps M1 vorkommt [4]. Die Funktion von SIC besteht in der Bindung von Regulatoren des Komplementsystems wie bspw. den humanen Plasmaproteinen Clusterin und HRG (*histidine-rich glycoprotein*) [4]. Zusätzlich hat SIC einen inhibitorischen Effekt auf zwei in PMNs vorkommende antibakterielle Peptide - α -Defensin und LL-37 [54], als auch gegen Lysozym und den sekretorischen Leukozyten-Proteinaseinhibitor [51].

S. pyogenes produziert eine Reihe von pyrogenen Exotoxinen (Spe's), die eine starke Ähnlichkeit mit Enterotoxinen von Staphylokokken aufweisen [101]. Die Expression der Exotoxine steht sowohl mit der Entstehung von Scharlach als auch mit dem STSS im Zusammenhang [31, 110]. Sie sind in der Lage T-Zellen zu stimulieren, was zur Freisetzung von großen Mengen an inflammatorischen Zytokinen und einer erhöhten Kapillardurchlässigkeit führt [87]. SpeB ist eine Cysteinprotease, die eine Vielzahl von Wirtsproteinen wie beispielsweise Fibrin [46], das antibakterielle Peptid LL-37 [143], Immunglobuline [30] und hochmolekulares Kininogen [65] spaltet. SpeB ist allerdings nicht nur in der Lage Wirtsproteine zu degradieren, sondern spaltet auch Oberflächenproteine der Streptokokken wie zum Beispiel die C5a-Peptidase oder Protein H [3] und setzt Fragmente des M Proteins frei [12].

SLO und SLS sind von *S. pyogenes* produzierte Exotoxine mit hämolytischer Aktivität. SLO und SLS sind in allen GAS-Isolaten zu finden, wobei SLS für die auf Blutagarplatten sichtbare β -Hämolyse verantwortlich ist [153]. Eine Rolle bei der Ausbreitung im Gewebe spielt die Streptokinase von *S. pyogenes*. Bei diesem Virulenzfaktor handelt es sich um ein sekretiertes Plasminogen-Bindungsprotein, das in den meisten Streptokokken-Isolaten vorkommt [71]. Streptokinase ist in der Lage gebundenes Plasminogen in Plasmin umzuwandeln [93]. Desoxyribonukleasen (A, B, C und D) sollen durch den Abbau von frei vorliegender DNA in eitrigen Abzessen die Viskosität herabsetzen.

2.2 Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen

Die Weiterleitung von Signalen durch die Zellmembran zu verschiedenen intrazellulären Zielen ist essentiell für nahezu alle Vorgänge in eukaryontischen Zellen wie bspw. den zellulären Metabolismus, Bewegungsvorgänge, Zellteilung und Differenzierung. Extrazelluläre Signale können sich dabei in physikalischer Form (mechanischer Stress, Licht) oder in molekularer Form (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Lipide) manifestieren. Molekulare Signale können auf der einen Seite durch direkte Penetration der Zellmembran, wie im Fall von Steroidhormonen, oder durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren (Rezeptor-Tyrosinkinasen, Adhäsionsrezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) vermittelt werden. Die intrazelluläre Weiterleitung erfolgt über eine Reihe verschiedener, biochemisch definierter Prozesse wie Proteinphosphorylierung, Protein-Protein-Interaktionen und durch die Bildung sog. *second messengers*. Die Signalprozesse müssen dabei sowohl räumlich als auch zeitlich genau kontrolliert werden, um Fehlfunktionen zu vermeiden.

2.2.1 Lipid Rafts

Lipid rafts sind in der Plasmamembran lokalisierte Mikrodomänen und weisen eine spezielle Lipid/Cholesterin-Komposition auf. Historisch gesehen basiert das *lipid raft*-Konzept auf biochemischen Daten zur Lipidphasentrennung und der polarisierten Verteilung von bestimmten Lipiden und Proteinen in Epithelzellen, insbesondere von apikalen Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Proteinen (GPI-APs). Diese GPI-APs sind assoziiert mit Zellmembranen, die resistent gegen die Extraktion mit nicht-ionischen Detergentien bei niedrigen Temperaturen sind, was auch zur Bezeichnung „detergentienresistente Membranen“ (DRMs) führte [22, 55].

Lipid rafts setzen sich aus Glykosphingolipiden, freiem Cholesterin und gesättigten Phospholipiden zusammen [64]. Darüber hinaus findet man aber auch verschiedene Proteine, wie Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, heterotrimere G-Proteine sowie myristylierte und palmitylierte Proteine wie bspw. Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen und Caveolin [80, 114]. Cholesterin interkaliert zwischen den Lipiden und verdichtet die Membranen dadurch. Dabei kommt es zur Bildung besonders fester Assoziate zwischen Cholesterin und den Sphingolipiden, so dass sich die Eigenschaften dieser Membranbereiche verändern. Diese Membransubdomänen werden als Lipiddomänen mit geordneter Phase beschrieben, die in einer ungeordneten Lipiddoppelschicht (*liquid disordered*, l_d) dispergiert sind. In dieser auch als *liquid-ordered* (l_o) bezeichneten Phase liegen die Acylketten der Lipide gestreckt und dichter gepackt vor. Sie besitzen aber trotzdem eine hohe laterale Mobilität. Die Größe variiert von 70-370 nm im Durchmesser [170, 67, 73]. Verschiedene Daten legen die Vermutung nahe, dass diese Membrandomänen klein und beweglich sind, aber durch bestimmte Proteine oder Antikörper-Quervernetzungen in sog. Caveolae oder größeren Domänen stabilisiert werden können. Diese Fähigkeit versetzt sie in die Lage, zu einer bestimmten Zeit bestimmte Proteine in einem lokal begrenzten Membranbereich zusammenzuführen. Darüber hinaus können *lipid rafts* bestimmte Proteine voneinander trennen und auf diese Weise ihre Aktivierung verhindern [184, 185].

Diese spezialisierten Membrandomänen stellen aufgrund ihrer Fähigkeit, Signaltransduktions-Plattformen zu bilden, ein attraktives Ziel für verschiedene Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten bzw. deren Toxine dar [83, 126, 61]. Prototypen bakterieller Toxine, die an *lipid rafts* binden, sind porenbildende Toxine wie bspw. Aerolysin oder Listeriolysin O, die *lipid rafts* als „Konzentratoren“ für die durch Oligomerisierung initiierte Porenbildung nutzen [1, 58]. Multimere Toxine hingegen nutzen *lipid rafts* nicht zu Konzentrationszwecken, sondern um mit Rezeptor-Clustern zu interagieren. Das Cholera Toxin bspw. nutzt seine pentamere Rezeptorbindungsdomäne um mit mehreren Gan-

glycosid G_{M1} -Molekülen zu interagieren, was zu einer hochaffinen Bindung des Toxins an unter anderem in Caveolae geclustertem G_{M1} führt [181]. Darüber hinaus sind auch Bakterien selbst in der Lage, an *lipid rafts* zu binden, darunter bspw. verschiedene Spezies von *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacteria* spp., *Chlamydia* spp., *Campylobacter jejuni* (zusammengefasst in [97]) als auch *Listeria monocytogenes* [151] und *Sphingomonas* spp. [7].

2.2.2 Die Src-Kinase-Familie

Proteinkinasen sind Enzyme, die die Übertragung einer Phosphatgruppe auf die Hydroxylseitenkette einer Aminosäure bestimmter Proteine katalysieren. Abhängig von der Aminosäure, deren Hydroxygruppe phosphoryliert wird, werden diese Enzyme in Protein-Serin/Threoninkinasen und Protein-Tyrosinkinasen unterteilt. Maning *et al.* [98] identifizierten im menschlichen Genom 478 typische und 40 atypische Protein-Kinasegene, darunter 385 Protein-Serin/Threoninkinasen und 90 Protein-Tyrosinkinasen. Die Proteinkinase-Familie ist damit die zweitgrößte Enzymfamilie. Sie spielen in vielen Signaltransduktions-Prozessen eine Rolle und regulieren verschiedene biochemische Prozesse.

Eine wichtige Klasse von Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen repräsentiert die Familie der Src Protein-Tyrosinkinasen. Die Src-Familie besitzt 11 Mitglieder, die zum Teil gewebespezifisch exprimiert werden. Die bekanntesten Vertreter sind Src, Yes und Fyn, die auch in allen Zelltypen exprimiert werden [166]. Sie spielen sowohl während des Wachstums und der Differenzierung eukaryontischer Zellen als auch bei Bewegungs- und Adhärenzvorgängen eine wichtige Rolle. Die Kinasen der Src-Familie werden durch Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen (RTKs), Integrin-Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Antigen- und Fc-gekoppelte Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren und Steroidhormon-Rezeptoren kontrolliert [166].

Src-Kinasen besitzen eine N-terminale Myristoyl-Gruppe, die kovalent mit einer SH4-Domäne verbunden ist. Die Myristoylierung spielt eine Rolle bei der Membranlokalisation und ist für die Funktion in Zellen essentiell. Wichtig für die Assoziierung mit anderen Molekülen und die Regulation der Aktivität sind die SH3-Domäne und die folgende SH2-Domäne. Letztere ist über einen SH2-Kinase-Linker mit der Protein-Tyrosinkinase-Domäne verbunden [23]. Die Aktivität von Src wird durch Phosphorylierung von zwei Phosphorylierungsstellen, Tyr⁴¹⁶ in der Kinasedomäne und Tyr⁵²⁷ im carboxyterminalen Teil des Moleküls, mit entgegengesetzten Effekten reguliert. Unter basalen Bedingungen *in vivo* sind 90-95% von Src an Tyr⁵²⁷ phosphoryliert, was mit einer intramolekularen Bindung von Phospho-Tyr⁵²⁷ an die SH2-Domäne einhergeht [187]. Das Enzym ist damit für externe Liganden nicht zugänglich. Die Phosphorylierung erfolgt durch andere Protein-

Tyrosinkinasen wie Csk und Chk [115, 188]. Die Phosphorylierung von Tyr⁴¹⁶ im sogenannten *activation loop* hingegen führt zur Aktivierung der Kinase durch Autophosphorylierung [23].

2.2.3 Rho GTPasen

Die Proteine der Rho Familie der kleinen GTPasen bilden eine Untergruppe der Ras Familie der 20-30 kDa großen, GTP-bindenenden Proteine, die in allen eukaryontischen Zellen zu finden sind. Zur Zeit sind 22 für Rho GTPasen-kodierende, tierische Gene beschrieben, wobei Rho, Rac und Cdc42 zu den am besten charakterisierten Vertretern gehören. Sie spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie bspw. der Änderung der Zellmorphologie, bei der Zellbewegung und der Zellteilung oder auch bei Endo- bzw. Phagozytosevorgängen.

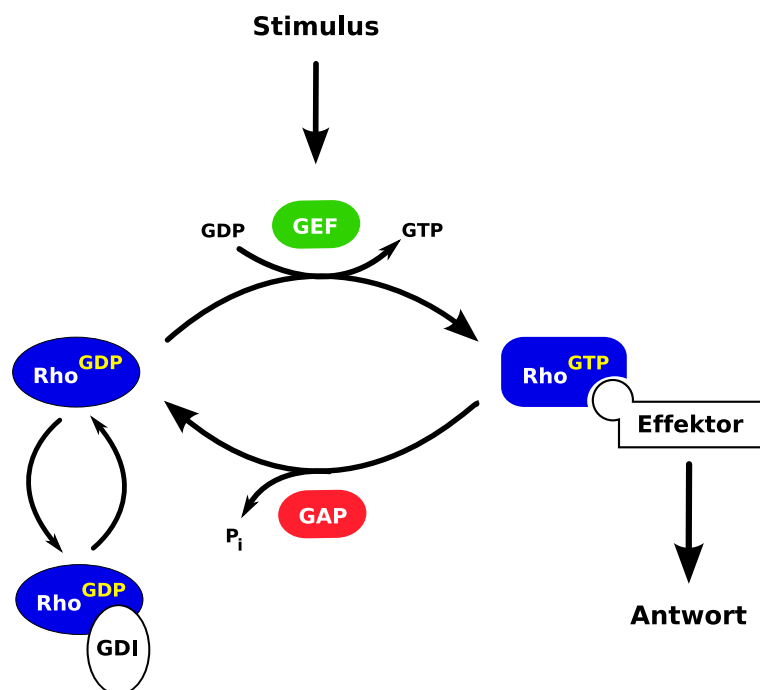


Abbildung 2.1: Der Rho GTPase-Zyklus. Rho GTPasen stellen molekulare Schalter dar, die zwischen einem aktiven, GTP-gebundenem und einem inaktiven, GDP-gebundenem Zustand wechseln. Die Aktivität wird durch GEFs, GAPs und GDIs kontrolliert.

2.2.3.1 Rho GTPasen - Moleküle mit Schalterfunktion

Ähnlich wie andere regulatorische GTPasen stellen auch die Rho GTPasen molekulare Schalter dar, die zwischen einem aktiven, gewöhnlich membranassoziierten, GTP-ge-

bundenen und einem inaktiven, in erster Linie zytosolischen, GDP-gebundenen Zustand wechseln (Abbildung 2.1). Diese Aktivität wird kontrolliert durch (i) Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren sog. GEFs, die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren, um den Schalter zu aktivieren [142]; (ii) GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase-Aktivität stimulieren, um den Schalter zu inaktivieren [14]; (iii) Guanin-Nukleotid-Dissoziierungsinhibitoren (GDIs), deren Rolle das Verhindern der spontanen Aktivierung sowie die Modulation von Membran- und Zytoplasma-Assoziierung zu sein scheint [119]. Letztendlich können die Rho GTPasen noch durch direkte Phosphorylierung und Ubiquitinylierung reguliert werden [88, 175]. Die physiologische Rolle dieser kovalenten Modifikationen ist jedoch unklar.

Ihre regulative Funktion im aktiven, GTP-gebundenen Zustand erfolgt über konformationsspezifische Interaktionen mit Effektorproteinen. Bisher wurden über 50 verschiedenen Effektoren für Rho, Rac und Cdc42 identifiziert, darunter Protein-Serin/Threoninkinasen, Protein-Tyrosinkinasen, Lipid-Kinasen, Lipasen, Oxidasen und Skelettproteine.

2.2.3.2 Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch GTPasen

Das Aktin-Zytoskelett eukaryontischer Zellen besteht aus Aktin und aktinbindenden Proteinen. Aktin liegt in der Zelle in zwei Formen vor. Die als globuläres Aktin (G-Aktin) bezeichneten Monomere können durch reversible, nicht-kovalente Bindung zu Filamenten (F-Aktin) polymerisieren, die in verschiedenen eigenständigen Strukturen organisiert sind: (i) Filopodien - fingerähnliche Fortsätze, die ein festes Bündel langer Aktin-Filamente enthalten. (ii) Lamellipodien - dünne, flächige Fortsätze aus einem dichten Geflecht von Aktin-Filamenten. (iii) Aktin-Stressfasern - Bündel von Aktin-Filamenten, die die Zelle durchziehen und über Fokalkontakte mit der extrazellulären Matrix verbunden sind. Der dynamische Auf- und Abbau dieser Strukturen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli bildet die Grundlage für viele Prozesse, die es eukaryontischen Zellen ermöglicht, ihre Form zu ändern, Ausstülpungen wie Filopodien oder Lamellipodien zu verlängern und Partikel zu umschließen.

Die Aktivierung von Rho, Rac oder Cdc42 führt zur Bildung von kontraktilen Aktin-Myosinfilamenten, protrusiven aktinreichen Lamellipodien bzw. Filopodien [48]. Diese hoch spezifischen Effekte auf das Aktinzytoskelett deuten auf eine genau definierte Serie von Signaltransduktionsvorgängen durch die jeweilige GTPase hin, die sowohl zur Bildung (Aktinpolymerisation) als auch zur Organisation (Filamentbündelung) der Aktinfilamente führen.

Auf molekularer Ebene erfolgt die Aktinpolymerisation durch das koordinierte Zusammenspiel von Aktin-Depolymerisationfaktoren, *capping*-Proteinen und einem der beiden

Hauptpolymerisationsfaktoren Arp2/3 bzw. Formin. Obwohl die Aktivität von Rac und Cdc42 zu Bildung von morphologisch unterschiedlichen, protrusiven Strukturen der Plasmamembran führt (Lamellipodien bzw. Filopodien) [136], initiieren beide GTPasen die periphere Aktinpolymerisation mit Hilfe des Arp2/3-Komplexes. Dieser Komplex besteht aus sieben konservierten Proteinen und wurde erstmals von Machesky *et al.* 1994 beschrieben [95]. Der Arp2/3-Komplex ist in allen eukaryontischen Zellen zu finden, wo er an der Seite bereits bestehender Aktinfilamente bindet und die Bildung eines neuen „Tochter“-Filaments initiiert [16, 6]. Beide GTPasen aktivieren Arp2/3 indirekt durch Mitglieder der sog. „Wiskott-Aldrich-Syndrom“-Proteinfamilie (WASP) [160]. Der zweite Weg der Aktinpolymerisation durch Proteine der Formin-Familie wird vorwiegend von Rho aktiviert. Formine bilden unverzweigte Aktinfilamente und werden durch Rho aktiviert [79].

2.2.4 Phospholipide und PI3-Kinase

Phosphatidylinositol (PtdIns), insbesondere die phosphorylierten Derivate dieses Membranphospholipids, stellen eine wichtige Gruppe von *second messengern* dar, die bei verschiedenen Vorgängen in eukaryontischen Zellen eine zentrale Rolle spielen. Als Antwort auf die Stimulation durch verschiedene Hormone oder Wachstumsfaktoren wird beispielsweise Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P₂) durch Phospholipase C (PLC) hydrolysiert, was zur Bildung der Signalmoleküle Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) führt. Die Bildung dieser *second messenger* stimuliert die Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen bzw. die Aktivität der Protein Kinase C (PKC). Neben der Hydrolyse durch PLC kann PtdIns(4,5)P₂ alternativ an den 3'-OH-Positionen des Inositolrings durch das Enzym Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) phosphoryliert werden, was zur Bildung von Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P₃) führt (Abbildung 2.2). In unstimulierten Zellen ist PtdIns(3,4,5)P₃ normalerweise nicht vorhanden, kann aber durch PI3K-Aktivität stark ansteigen. PtdIns(3,4,5)P₃ wirkt dann als *second messenger*, der verschiedene Proteinkinasen (PKC, Akt) als Antwort auf die Stimulation aktiviert.

2.2.4.1 PI3-Kinase-Klassen

Tierische Zellen besitzen verschiedene PI3Ks, die aufgrund ihrer Substratspezifität, der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und regulatorischer Mechanismen in drei Hauptklassen unterteilt werden können. Klasse I PI3Ks nutzen hauptsächlich Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat als Substrat, das in das Produkt Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat umgewandelt wird. Ihre Aktivität ist stark von der Stimulation durch Agonisten abhängig, was zu erheblichen Fluktuationen in den zellulären Spiegeln von Ptd-

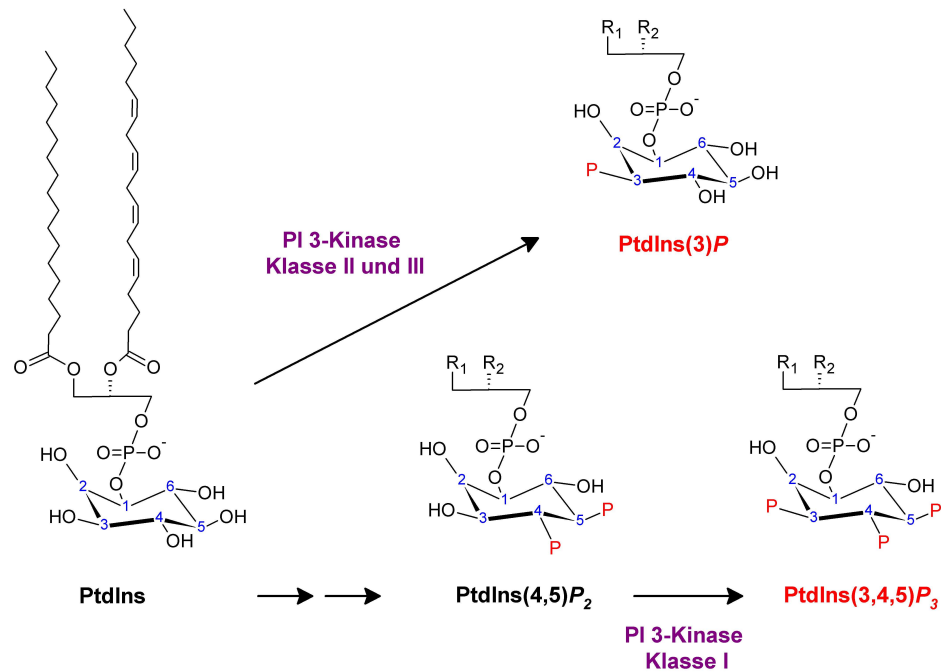


Abbildung 2.2: Biochemische Aktivitäten der PI3-Kinasen. Phosphatidylinositole können in der Position 3, 4, und 5 der Inositol-Kopfgruppe phosphoryliert werden. Dargestellt sind die Substrate und die katalytischen Produkte der drei PI 3-Kinaseklassen.

Ins(3,4,5)P₃ führt. Während Subklasse IA typischerweise durch RTKs oder Immunglobulin G-Rezeptoren (FcγR) aktiviert werden, erfolgt die Aktivierung der Subklasse IB Enzyme durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Klasse II PI3Ks nutzen vorrangig PtdIns als *in vivo* Substrat und bilden das Produkt Phosphatidylinositol (3)-Phosphat (PtdIns(3)P). Klasse II PI3Ks können ähnlich wie Klasse I Enzyme durch externe Stimuli aktiviert werden. Im Gegensatz dazu repräsentiert die Klasse III der PI3Ks nur eine einzige Spezies (hVPS34) im Menschen, die auch in unstimulierten Zellen eine hohe Aktivität aufweist. Darüber hinaus kann die Aktivität durch die kleine GTPase Rab5, die wiederum durch RTKs aktiviert werden kann, zusätzlich erhöht werden [28, 109]. Die unterschiedlichen Substratpräferenzen und Aktivierungsmechanismen haben große Konsequenzen hinsichtlich ihrer Funktion, die sowohl die Regulation von zytoskelettalen und enzymatischen Funktionen als auch Signaltransduktions- und Transportvorgänge umfassen.

Die Aktivität von PI3Ks lässt sich durch mehrere Inhibitoren beeinflussen. Der klassische PI3K-Inhibitor ist Wortmannin, eine von Pilzen produzierte Verbindung, deren IC₅₀ bei ~ 10 nM liegt [183]. Ein weiterer Inhibitor ist die Verbindung LY294002, der mit einer IC₅₀ von 1,5 μM jedoch weniger potent als Wortmannin ist [173]. Der Vorteil von LY294002 liegt in seiner höheren Stabilität. Beide Verbindungen inhibieren wirkungsvoll alle Klassen von

PI3Ks mit Ausnahme des ubiquitär exprimierten Klasse II Enzyms PI3K-C2 α , welche ca. 10fach resistenter als andere PI3Ks ist [169].

2.2.4.2 Effektoren der PI3-Kinasen

Das Hauptprodukt der Klasse I PI3Ks PtdIns(3,4,5) P_3 interagiert mit verschiedenen Proteinen, die eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) besitzen [91, 35]. Beispiele für Proteine mit PH-Domäne sind GRP1, ein GEF der GTPase Arf, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt ist, und die phosphatidylinositolabhängige Kinase 1 (PDK1) sowie die Proteinkinase Akt, die anti-apoptotische und wachstumsfördernde Signalwege kontrollieren. Akt ist auch unter dem Namen Proteinkinase B (PKB) bekannt und einer der am besten charakterisierten Effektoren von Klasse I PI3Ks. Die Bindung von PtdIns(3,4) P_2 resultiert in einer 3-5fachen Erhöhung der Aktivität von Akt *in vitro*. Für die vollständige Aktivierung von Akt *in vivo* ist jedoch die Phosphorylierung von zwei spezifischen Aminosäuren, Thr³⁰⁸ in der Kinasedomäne und von Ser⁴⁷³ im C-terminalen Teil des Proteins, notwendig. Für die Phosphorylierung ist PDK1, welche ebenfalls eine PH-Domäne besitzt, verantwortlich [8]. Diese Domäne vermittelt, wie im Fall von Akt, eine hochaffine Bindung an PtdIns(3,4) P_2 und PtdIns(3,4,5) P_3 und die damit einhergehende Rekrutierung an die Zellmembran. Der vorgeschlagene Mechanismus der Aktivierung von Akt beginnt mit der Rekrutierung zur Zellmembran, wo die Bindung an die Lipide zu einer Konformationsänderung führt, die mit der Phosphorylierung der Aminosäuren Thr³⁰⁸ und Ser⁴⁷³ einhergeht.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Klasse I PI3Ks wichtige Aktivatoren von Rac1 sind (vgl. Kapitel 2.2.3). In Studien mit PI3K-Inhibitoren und dominant negativen Formen der PI3K wurde eine Abhängigkeit der Rac1-Aktivierung von dieser Kinase sowohl im Fall von tyrosinkinaseabhängigen Rezeptoren als auch bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nachgewiesen [178, 112]. Die konstitutiv aktive Form der Kinase führt zu Bildung von sog. *membrane ruffles* auch ohne Stimulation durch Wachstumsfaktoren [138]. Die biochemischen Vorgänge, die zur Aktivierung von Rac1 führen, sind jedoch nur unvollständig verstanden. Eine Schlüsselstellung nehmen hierbei die GEFs ein, die von Rezeptoren kommende Signale an GTPasen weiterleiten. Es wurden verschiedene PtdIns(3,4,5) P_3 -abhängige als auch -unabhängige GEFs wie bspw. Tiam1 bzw. Vav1/2 identifiziert, die eine Rolle bei der Ras- und RTK-vermittelten Rac-Aktivierung spielen [85, 26].

PtdIns(3) P , das Produkt von Klasse II und III PI3Ks, bindet ebenfalls verschiedene Effektorproteine. Bei der ersten identifizierten Domäne handelt es sich um die FYVE-Zinkfinger-Domäne (in Fab1, YOTB, Vac1 und EEA1 konservierte Domäne), die evolutionär hochkonserviert ist [156]. Die zweite bekannte PtdIns(3) P -bindende Domäne ist die Phox-

Homologie-Domäne [47]. Effektoren mit FYVE-Domänen spielen insbesondere bei Membranfusionsvorgängen eine Rolle. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von PI3Ks bei endozytotischen Prozessen gaben Versuche, bei denen eine Blockierung der endosomalen Fusionsprozesse in der Gegenwart von Wortmannin beobachtet wurde [76]. Weitere Studien zeigten, dass die aktive (GTP-gebundene) Form von Rab5, die mit frühen Endosomen assoziiert ist, die regulatorische p150-Untereinheit von hVPS34 binden kann [28, 109]. Diese Interaktion führt zur endosomalen Lokalisierung von hVPS34 und der Generation von PtdIns(3)P auf der endosomalen Membran, die mit der Rekrutierung von Effektoren mit FYVE-Domänen wie bspw. EEA1 (*early endosomal antigen 1*) einhergehen [154, 28].

2.3 Durch *S. pyogenes* aktivierte Signaltransduktionswege in eukaryontischen Zellen

Während der Evolution haben pathogene Bakterien eine Reihe von Strategien entwickelt um im Wirtsorganismus zu überleben, darunter solche, die es ihnen ermöglichen die Immunabwehr des Wirtes zu umgehen oder in geschützten Nischen, d. h. den Wirtszellen zu überleben. Viele Bakterien besitzen ein ganzes Arsenal an verschiedenen Techniken, die auf Signaltransduktionsmechanismen des Wirtes zurückgreifen, um beispielsweise die Aufnahme in dessen Zellen auszulösen. Angriffspunkte sind Signaltransduktionsplattformen in der Zellmembran (*lipid rafts*) oder das Aktin-Zytoskelett und dessen Regulatoren (zusammengefasst bei [97, 129] bzw. [140]). Im Folgenden sollen einige Signaltransduktionswege, die von *S. pyogenes* genutzt werden, um die Internalisierung auszulösen, näher beschrieben werden.

Gruppe A Streptokokken, wie auch *Staphylococcus aureus*, wurden lange Zeit als ausschließlich extrazelluläre Pathogene betrachtet. Die erste Arbeit, die die Invasion von *S. pyogenes* in nicht-phagozytische Zellen *in vitro* beschrieb, wurde 1994 von LaPenta *et al.* veröffentlicht [90]. Es wurde gezeigt, dass die Internalisierung von der Fibronektinbindung durch die Streptokokken und der nachfolgenden Interaktion des gebundenen Fibronektins mit Integrinen der Wirtszellen abhängig ist [104, 123]. Invasine, die über diesen Mechanismus die Aufnahme in die Wirtszellen auslösen können, sind das Protein SfbI (auch als Protein F1 bezeichnet) und das M1 Protein [104, 74, 36]. Die Signaltransduktionsprozesse in den Wirtszellen, die durch beide Proteine ausgelöst werden, wurden bereits näher untersucht. Sie sind jedoch noch nicht vollständig verstanden.

Im Fall von Protein F1 wurde die transiente Bildung eines, den fokalen Adhäsionsplaques von eukaryontischen Zellen ähnlichen Komplexes beobachtet, der mit der Rekrutierung der *focal adhesion kinase* (FAK) nach dem Clustern von Integrinen eingeleitet wird. Nach

der Autophosphorylierung von FAK und der damit einhergehenden Rekrutierung der Src-Kinase kommt es im weiteren Verlauf zu Phosphorylierungen von Paxillin und FAK. Außerdem konnte durch die Autoren eine Beteiligung der GTPasen Rac und Cdc42 nachgewiesen werden [124]. Am Aufnahmeprozess von SfbI-exprimierenden Streptokokken sind außerdem Caveolae, d. h. spezielle Domänen in der Plasmamembran der Wirtszellen beteiligt (siehe Kapitel 2.2.1). Diese Streptokokken sind so in der Lage die Fusion mit Lysosomen zu vermeiden und in einer geschützten Nische in der Wirtszelle zu persistieren [165].

Der M1-vermittelten Internalisierung liegt zwar auch die Bildung von Integrin-Clustern zugrunde, die aktivierten Signalmoleküle unterscheiden sich allerdings. So ist dieser Mechanismus beispielsweise Genistein insensitiv. In diesem Fall kommt es, nach der Bildung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinclustern, zu einer PI3K-abhängigen Aktivierung der *integrin-linked kinase* (ILK). Die aktivierte ILK wiederum ist in der Lage, als Adaptor und Signalvermittler für FAK und Paxillin zu fungieren, woraufhin es zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und zur Aufnahme der Streptokokken kommt [133, 174]. Das intrazelluläre Kompartiment, in dem die Bakterien in diesem Fall nach der Aufnahme verbleiben, ist noch jedoch unbekannt.

Eine weitere bakterielle Struktur, die die Aktivierung von Signalwegen in den Wirtszellen auslöst, stellt die Hyaluronsäurekapsel dar. Ein Rezeptor, der die Signale in das Innere der Zellen weiterleitet, ist in diesem Fall das Protein CD44, ein eukaryontischer Hyaluronsäurerezeptor. Dieser fibronektinunabhängige Prozess führt zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts und zur Öffnung der interzellulären Verbindungen in polarisierten Keratinozyten. Beteiligt an den zytoskelettalen Veränderungen sind die GTPase Rac1, das Protein Ezrin, das eine Verbindungsfunktion zwischen CD44 und F-Aktin ausübt, sowie die Tyrosinphosphorylierung weiterer Wirtsproteine. Die Autoren bringen diese Aktivierungsvorgänge mit der Gewebepenetration durch *S. pyogenes* auf einer parazellulären Route in Verbindung [39].

Diese Beispiele verdeutlichen, dass Streptokokken in der Lage sind, verschiedene Signalwege in den Wirtszellen zu manipulieren, um ihre eigene Aufnahme auszulösen und intrazellulär zu persistieren oder in tiefere Gewebe vorzudringen. Neben diesen angesprochenen Beispielen findet man in der Literatur zudem weitere, bei denen die molekularen Mechanismen bislang noch völlig unverstanden sind [105].

2.4 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die an der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 – repräsentiert durch das klinische Isolat A128 – beteiligten Signaltransduktionsmechanismen in Endothelzellen humanen Ursprungs untersucht werden. Das Hauptaugenmerk sollte dabei auf der Untersuchung der molekularen Mechanismen liegen, die an der Bildung der Membranausstülpungen und den Veränderungen des Aktinzytoskeletts während der Internalisierung der Bakterien beteiligt sind. Insbesondere die Rolle von Membranmikrodomänen, der Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie, der PI3-Kinasefamilie und der GTPase Rac1 auf der Wirtsseite sollte näher charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biorad, Fluka, New England Biolabs, Merck, Promega, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen. Alle Substanzen hatten die Reinheitsgrade 'p.a.' bzw. 'reinst'. Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt, das mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde. Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner, Nunc und PPT bezogen. Zellkulturmedien und Zusätze wurden bei Gibco BRL, PAA und PromoCell erworben.

3.2 Verwendete Bakterienstämme

In der Arbeit wurden die in Tabelle 3.1 und 3.2 aufgeführten *S. pyogenes*- und *E. coli*-Stämme verwendet. Die pGEX-Vektoren stammten von Pharmacia, der pEGFP-C1-Vektor von Clontech.

Stamm	Geno-/Phänotyp	Referenz/Herkunft
<i>S. pyogenes</i> A 40	Rachenisolat, M12-Typ, <i>sfbI</i> ⁺	[105]
<i>S. pyogenes</i> A 128	Blutisolat, M3-Typ	Münster

Tabelle 3.1: Verwendete *S. pyogenes*-Stämme

Stamm	Plasmid	Insert	Referenz/Herkunft
<i>E. coli</i> HB101	pGEX-6P-1	-	A. Nerlich, Diplomarbeit 2003
<i>E. coli</i> HB101	pGEX-2TK	PAK-CRIB-Domäne	zur Verfügung gestellt durch Prof. I. Just (MH Hannover)
<i>E. coli</i> HB101	pEGFP-C1	wtRac1	I. Sastalla, Diplomarbeit 2002
<i>E. coli</i> HB101	pEGFP-C1	N17Rac1	I. Sastalla, Diplomarbeit 2002

Tabelle 3.2: Verwendete *E. coli*-Stämme

3.3 Antikörper

Antikörper	Verdünnung		Herkunft
	WB	IF	
Anti- β -Aktin, Klon mAbcam8226, monoklonal	1:5000		Abcam
Anti- α -Actinin, BM.75.2, monoklonal		1:200	Sigma
Anti-Phospho-Akt, polyklonal, Kaninchen	1:1000		CS
Anti-Akt1, polyklonal, Ziege	1:1000		St. Cruz
Anti-p16, monoklonal, Hybridoma-ÜS		unverd.	[117] ¹
Anti-Caveolin 1, polyklonal, Kaninchen		1:50	St. Cruz
Anti-EEA1, Klon 14, monoklonal		1:50	BD
Anti-GAS, polyklonal, Kaninchen		1:200	[164]
Anti-LAMP1, Klon H4A3 monoklonal		1:50	BD
Anti-Rac1, Klon 102, monoklonal	1:1000		BD
Anti-Phosphotyrosin, PY20, monoklonal		1:50	St. Cruz
Anti-Phospho-Src, polyklonal, Kaninchen	1:2000		Biosource
Anti-Src (SRC2), polyklonal, Kaninchen	1:1000	1:50	St. Cruz

Tabelle 3.3: Verwendete Primärantikörper WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, CS: Cell Signalling, BD: BD Bioscience, ¹zur Verfügung gestellt durch T. Stradal (Helmholtz HZI)

Antikörper	Markierung	Verdünnung	Herkunft
Ziege Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 488	1:200	Molecular Probes
Ziege Anti-Kaninchen IgG	Alexa Fluor® 568	1:300	Molecular Probes
Ziege Anti-Kaninchen IgG	Cy5	1:200	Dianova
Ziege Anti-Maus IgG	Alexa Fluor® 488	1:200	Molecular Probes
Ziege Anti-Maus IgM	Rhodamin	1:200	Sigma
Ziege Anti-Kaninchen IgG	HRP	1:3000	Dianova
Ziege Anti-Maus IgG	HRP	1:3000	Sigma
Kaninchen Anti-Ziege IgG	HRP	1:3000	Dianova

Tabelle 3.4: Verwendete Sekundärantikörper

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Medien für die Kultivierung der Bakterien

Vor Gebrauch wurden die folgenden Komplexmedien für die Kultivierung der Bakterien durch 15minütiges Autoklavieren bei 1 bar Überdruck und 121°C sterilisiert.

<u>Luria Bertani (LB):</u>	10,0 g/l	NaCl
	10,0 g/l	Bacto Trypton
	5,0 g/l	Bacto Hefeextrakt
<u>Tryptic Soy Broth (TSB):</u>	30,0 g/l	TSB Fertigmischung
<u>Todd Hewitt Yeast (THY):</u>	36,4 g/l	THB Fertigmischung
	5,0 g/l	Bacto Hefeextrakt

Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien vor dem Autoklavieren jeweils 15,0 g Agar pro Liter zugesetzt.

3.4.2 Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *S. pyogenes* erfolgte in dem Flüssigmedium TSB stehend bei 37°C über Nacht in einem Brutschrank (Haereus). Zur langfristigen Stammhaltung wurden 750 µl einer Übernachtskultur mit 250 µl steriler Glycerinlösung in einem Kryoröhrchen vermischt und bei -80°C gelagert.

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Medium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin (Stock: 100 mg/ml in ddH₂O) bei 37°C und 150 rpm in einem Schüttelinkubator (Infors). Für die langfristige Stammhaltung wurden 750 µl einer Übernachtskultur mit 250 µl steriler Glycerinlösung in einem Kryoröhrchen vermischt und bei -80°C gelagert.

3.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Streptokokken

<u>1× PBS:</u>	1,44 g/l	Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
	0,24 g/l	KH ₂ PO ₄
	8,00 g/l	NaCl
	0,20 g/l	KCl

Zur direkten Fluoreszenzmarkierung wurden im ersten Schritt die Bakterien in PBS auf $10^8 - 10^9$ cfu ml⁻¹ eingestellt. 240 µl dieser Suspension wurden anschließend mit 60 µl einer 0,5 mM Alexa Fluor® 568-Succinimidylesterlösung (Molecular Probes) gemischt und 15 min bei 4°C schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien dreimal mit PBS gewaschen, um den nichtgebundenen Farbstoff zu entfernen.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

<u>TAE:</u>	50 mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, DNA der Größe nach aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgte in einer HORIZON® 58 Gelkammer (Gibco) in 0.8%igen Gelen. Dazu wurde Agarose in TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle aufgeköcht. Die flüssige Agarose wurde in einen Gelträger gegossen und nach der Verfestigung mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 6× Ladepuffer (Fermentas) versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Als Größenstandard diente die 1 kb-Leiter von Fermentas. Die Auftrennung erfolgte bei 80 Volt. Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT 2020) sichtbar gemacht und mit einem EASY-System (Herolab) dokumentiert.

3.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidaufreinigung im präparativen Maßstab erfolgte mit dem EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die aufgereinigte Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

3.5.3 Photometrische Quantifizierung von DNA

Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt. Dazu wurde die DNA verdünnt und in einer Quartzküvette bei 260 nm (OD_{260}) in einem Ultrospec III Photometer (Pharmacia) vermessen. Die Konzentration der DNA berechnet sich wie folgt:

$$c \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

mit V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA).

3.6 Zellbiologische Methoden

3.6.1 Säurereinigung von Deckgläschen

Um Fertigungsrückstände von den Deckgläschen zu entfernen, wurden diese für 4-16 Stunden in einem locker verschlossenen Becherglas in 1 M HCl unter gelegentlichem Schwenken erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Deckgläschen intensiv mit ddH₂O gewaschen und danach einzeln auf Whatman-Papier getrocknet. Die Sterilisation erfolgte bei 180°C für drei Stunden in einem Trockenschrank (Haereus). Es wurden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm verwendet (Nunc).

3.6.2 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Um den Zellen die Anheftung auf der Oberfläche der Kulturgefäße bzw. der Deckgläschen zu erleichtern wurden diese mit Gelatine beschichtet. Zu diesem Zweck wurden die Zellkulturgefäße oder Deckgläschen mit einer 0,1%igen (w/v) Gelatinelösung in ddH₂O überschichtet, so dass der Boden gerade bedeckt war. Es erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C im Zellkulturinkubator. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Gefäße wurden unmittelbar zur Aussaat der Zellen benutzt.

3.6.3 Standardzellkultur

3.6.3.1 HUVEC

HUVEC wurden kryokonserviert (0. Passage) von Clonetics gekauft. Die Zellen wurden standardmäßig in EGM 2-Medium, supplementiert mit dem SupplementPack (Promo-Cell), unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin in gelatinebeschichteten Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre in einem Zellkulturinkubator (Forma Scientific) kultiviert. Für die Versuche wurden nur Zellen in der 4.-7. Passage verwendet.

3.6.3.2 SYF und SYF + c-Src

SYF- und SYF + c-Src-Zellen [78] wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit 4500 mg/l Glukose unter Zusatz von 10% FCS, 0,2 mM Glutamin, 1% nichtessentielle Aminosäuren, 1% Natriumpyruvat und Penicillin/Streptomycin in Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre in einem Zellkulturinkubator (Forma Scientific) kultiviert.

3.6.4 Subkultivierung von eukaryontischen Zellen

HUVEC wurden mit dem DetachKit (PromoCell) abtrypsinisiert. Dazu wurden die Zellen bei Erreichen einer Dichte von ca. 90% zuerst mit 5 ml HepesBSS gewaschen, um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen, und anschließend mit 3 ml Trypsinlösung inkubiert bis sich die Mehrzahl der Zellen abgerundet hatte. Danach wurden 7 ml Trypsininhibitorlösung zugegeben und die Zellen vorsichtig von der Platte gespült, bei $900 \times g$ für 10 min zentrifugiert und danach in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in der gewünschten Verdünnung in gelatinebeschichteten Zellkulturgefäßen (Kapitel 3.6.2) ausgesät.

Die SYF- und SYF + c-Src-Zellen wurden zur Subkultivierung einmal mit PBS gewaschen um Mediumreste und tote Zellen zu entfernen und anschließend mit 3 ml Trypsin-/EDTA-Lösung (0,05%ig/0,02%ig) inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 7 ml Medium inaktiviert. Die Zellen wurden danach in der gewünschten Verdünnung in gelatinebeschichteten Zellkulturgefäßen (Kapitel 3.6.2) ausgesät.

Für Infektionsversuche wurde die Zellzahl der abtrypsinisierten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellzahl auf $1,5 \times 10^5$ Zellen ml^{-1} für Infektionsversuche mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung oder rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen bzw. auf $3,0 \times 10^5$ Zellen ml^{-1} für Plattierungsversuche (SYF- und SYF + c-Src-Zellen) eingestellt. In Zellkulturplatten mit 15 mm Durchmesser großen Vertiefungen (4well- oder 24well-Platten) wurden 500 μl Medium vorgelegt und 500 μl der verdünnten Zellsuspension ausgesät und wie oben beschrieben inkubiert. Für licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen auf sterilen und beschichteten Deckgläschen ausgesät (siehe Kapitel 3.6.1 und 3.6.2). Alle Lösungen und Medien wurden vor dem Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

3.6.5 Transfektion von HUVEC

Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben aufgereinigt. Die Transfektion erfolgte mit einem Nucleofector[®] I (Amaxa) unter Verwendung des HUVEC Nucleofector[®] Kit (Amaxa). Die Zellen wurden zwei Tage vor der Transfektion passagiert. Es wurden nur Zellen verwendet, die am Tag der Transfektion ca. 80-90% konfluent waren.

Vor der Transfektion wurden die Zellen wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben abtrypsinisiert und die Zellzahl wurde bestimmt. Ungefähr 5×10^5 HUVEC und 1 μg Plasmid-DNA wurden in 100 μl der vorbereiteten Nucleofector-Lösung resuspendiert. Die Transfektion wurde unter Verwendung von Programm A-34 durchgeführt. Unmittelbar danach wurden 500 μl vorgewärmtes Medium zugegeben und jeweils 300 μl der Zellsuspension in

vorbereiteten Kulturgefäßen auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C/5% CO₂ inkubiert.

3.6.6 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Es wurden verschiedene Inhibitoren verwendet, um mit der Aufnahme der Streptokokken in die Zellen zu interferieren. Genistein ist ein allgemeiner Tyrosinkinase-Inhibitor. Bei PP2 handelt es sich um einen Inhibitor, der spezifisch für die Src-Kinasefamilie ist. Zu Kontrollzwecken wurde auch PP3, das inaktive Homolog von PP2 verwendet. LY294002 inhibiert Kinasen der PI3K-Familie. Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Um eine Beeinflussung der Internalisierung durch das Lösungsmittel auszuschließen wurde die Wirkung der entsprechenden DMSO-Konzentrationen auf die Aufnahme der Bakterien untersucht. In Tabelle 3.5 sind die eingesetzten Konzentrationen und die Prä-Inkubationszeiten angegeben. Die Inhibitoren wurden in Zellkulturmedium auf die Endkonzentrationen verdünnt.

Inhibitor	Konzentration [µM]	Lösungs- mittel	Prä-Inkubations- zeit [min]
Genistein	10 - 25	DMSO	60
PP2	0.5 - 10.0	DMSO	15
PP3	10	DMSO	15
LY294002	25	DMSO	45

Tabelle 3.5: Eingesetzte Inhibitoren und deren Konzentration.

3.6.7 Infektion von HUVEC mit GAS

3.6.7.1 Infektion nach Standard-Protokoll

Die Internalisierung der Streptokokken in HUVEC wurde licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen wie in Kapitel 3.6.4 beschrieben auf sterilen Deckgläschen ausgesät und am Tag der Infektion zweimal mit antibiotikafreiem EGM 2-Medium mit 2% FBS gewaschen und 250 µl frisches Medium zu den Zellen gegeben. Alle Lösungen und Medien wurden vor dem Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

Die Bakterien wurden in 45 ml TSB bei 37°C über Nacht angezogen. Vor der Infektion wurden sie zehn Minuten bei 3000 × g (Megafuge 1.0, Haereus) zentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde im Photometer (Novaspec II, Pharmacia) auf eine Transmission von

10% bei 600 nm eingestellt. Die Zellen wurden mit den Bakterien (MOI = 10) infiziert und im Zellkulturinkubator (Forma Scientific) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach den entsprechenden Infektionszeitpunkten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend fixiert.

3.6.7.2 Synchronisierte Infektion

Um die Aktivierung verschiedener eukaryontischer Signalmoleküle zu untersuchen, wurde die Infektion mit *S. pyogenes* synchronisiert. Zur Validierung des Protokolls wurden die Zellen auf gelatinebehandelten Deckgläschen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in gelatinebehandelte Zellkultur-schalen mit 6 cm Durchmesser ausgesät.

Die Bakterien wurden in 45 ml TSB bei 37°C über Nacht angezogen. Vor der Infektion wurden sie 10 min bei 3000 × *g* (Megafuge 1.0, Haereus) zentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde im Photometer (Novaspec II, PHARMACIA) auf eine Transmission von 10% bei 600 nm eingestellt und in EGM 2-Medium ohne Antibiotika, das auf ca. 22°C temperiert war, verdünnt.

Nach den gegebenenfalls durchgeführten Prä-Inkubationen mit serumreduziertem Medium und/oder Inhibitoren wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml (6 cm Platte) bzw. 200 µl (Deckgläschen) Bakteriensuspension (MOI = 50) bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen, auf 37°C vorgewärmtes Medium zugegeben und die Zellen im Zellkulturinkubator (37°C, 5% CO₂, Forma Scientific) weiter inkubiert. Zur Herstellung von Zell-Lysaten wurden die Zellen wie in Kapitel 3.6.9 oder 3.7.7 behandelt bzw. die Zellen auf den Deckgläschen wurden für mikroskopische Untersuchungen fixiert.

3.6.8 Infektion von SYF- und SYF + c-Src-Fibroblasten mit GAS

Die Internalisierung der Streptokokken in SYF- und SYF + c-Src-Fibroblasten wurde mit einem modifizierten Gentamycin-Assay untersucht. Die Fibroblasten wurden 16 Stunden vor der Infektion in antibiotikafreiem DMEM/Hepes, das 10% FCS enthielt, ausgesät. Alle Lösungen und Medien wurden vor dem Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

Die Bakterien wurden in 45 ml TSB bei 37°C über Nacht angezogen. Vor der Infektion wurden sie 10 min bei 3000 × *g* (Megafuge 1.0, Haereus) zentrifugiert, mit 10 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde im Photometer (Novaspec II, Pharmacia) auf eine Transmission von 10% bei 600 nm eingestellt.

Die Zellen wurden vor der Infektion einmal mit DMEM/Hepes gewaschen und 250 µl frisches Medium wurde zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit den Bakterien (MOI = 10) infiziert und im Zellkulturinkubator (Forma Scientific) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 30, 60 oder 120 Minuten wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und die extrazellulären Streptokokken wurden durch Zugabe von DMEM/Hepes mit 5 µg ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Gentamycin abgetötet. Nach einer Stunde Inkubation wurden die infizierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 100 µl Trypsinlösung und 400 µl Triton X-100-Lösung (0,025%) pro Vertiefung abgelöst und lysiert. Die Lysate wurden entsprechend verdünnt und auf THY-Agar ausplattiert. Nach 18 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Anzahl der Kolonien auf den Platten quantifiziert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und die Zellen wurden wie oben beschrieben infiziert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen fixiert.

3.6.9 Herstellung von Zelllysaten

<u>NP-40-Puffer:</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	1%	(v/v)	NP-40
	5%	(v/v)	Glycerin
	2	mM	Na ₃ VO ₄
	2	mM	NaF
	2	mM	PMSF
	MiniComplete Protease Inhibitor Mix (ROCHE)		

Die Protease- und Phosphataseinhibitoren wurden dem Puffer erst unmittelbar vor dem Experiment zugesetzt, um eine optimale Hemmung zu erreichen. Na₃VO₄ wurde zusätzlich, wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben, aktiviert.

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellmonolayer einmal mit eiskaltem PBS mit 1 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂ gewaschen. Anschließend wurden 50 µl NP-40-Puffer pro 6 cm Schale zugegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte geschabt und für 15 min bei 4°C auf einem Schüttler (WT12, Biometra) inkubiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 15.000 ×g und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf) um Zelltrümmer zu entfernen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde bestimmt (Kapitel 3.7.2.1) und die Proteinmengen der Proben anschließend normalisiert.

Nach Zugabe der entsprechenden Menge 5× Probenpuffer (siehe Kapitel 3.7.3) wurden die Proben für fünf Minuten bei 95°C aufgekocht und dann zur Lagerung bei -80°C eingefroren oder direkt auf ein PA-Gel geladen (siehe Kapitel 3.7.3).

3.7 Biochemische Methoden

3.7.1 Aktivierung von Na_3VO_4

Das Natriumorthovanadat wurde vor der Benutzung aktiviert, um eine maximale Inhibition der Proteintyrosinphosphatasen zu erreichen. Bei diesem Prozess wird das Natriumorthovanadat depolymerisiert, wodurch die hemmende Wirkung gesteigert wird.

Zu diesem Zweck wurde Na_3VO_4 für eine 200 mM Lösung (10 ml) eingewogen und in ddH₂O gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH-Lösung auf 10 eingestellt. Die anfangs klare Lösung wird dabei gelblich. Anschließend wurde die Lösung gekocht, bis sie wieder farblos wurde, auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert wieder auf 10 eingestellt und die Lösung erneut aufgekocht. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis sich die Farbe der Lösung nicht mehr veränderte. Das Volumen wurde auf 10 ml eingestellt und das aktivierte Na_3VO_4 aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

3.7.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mit dem Bradford-Test bestimmt. Dieser Test beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 nach der Bindung an Proteine von 465 nm hin zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

10 µl der zu vermessenden Probe wurden zu 790 µl ddH₂O gegeben und mit 200 µl 5× Bradford-Reagenz (Sigma) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben im Photometer (Novaspec II, Pharmacia) bei 595 nm vermessen. Der Nullabgleich wurde mit dem verdünnten Puffer durchgeführt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (Fraktion V, BSA).

3.7.2.2 Messung der Optischen Dichte (OD)

Eine weitere Methode zur Abschätzung der Proteinkonzentration ist die Messung der Absorption bei 280 nm im Photometer. Als Referenz dient der jeweilige Puffer. Es gilt in erster Annäherung: Konzentration in mg/ml = Absorption bei 280 nm.

Genauere Ergebnisse erhält man, wenn der molare Extinktionskoeffizient ϵ abgeschätzt und der Berechnung zu Grunde gelegt wird [125]. In diesem Fall wird der Tryptophan-, Tyrosin- und Cysteingehalt des Proteins mit in die Berechnung einbezogen.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein analytisches Verfahren, zur Untersuchung von Proteingemischen. Die Proteine werden in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) und anderen denaturierenden Reagenzien elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladenen SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine, wodurch sich diese entfalten und ihre Eigenladung neutralisiert wird. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol oder Dithiotretol (DTT) werden außerdem alle im Molekül vorhandenen Disulfidbrücken gespalten. Die Proteine wandern aufgrund der negativen Ladung des SDS zur Anode und werden entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Bei dem von Laemmli [82] beschriebenen diskontinuierlichen System werden im ersten Schritt die Proteinproben in einem niederprozentigen Sammelgel mit einem pH-Wert von 6,8 aufkonzentriert und wandern von dort in das höherprozentige Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8, wo sie anschließend aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden. Es wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

<u>Acrylamidlösung:</u>	30,0% (w/v) Acrylamid
	0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid

Diese Lösung wurde als fertige Stammlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth) bezogen.

<u>Sammelgel (5%):</u>	1,40 ml	ddH ₂ O
	0,33 ml	Acrylamidlösung
	0,25 ml	Tris-HCl (pH 6,8)
	0,02 ml	10% (w/v) SDS-Lösung
	0,02 ml	10% (w/v) APS
	2,00 μ l	TEMED
<u>Trenngel:</u>	10%	15%
	1,90 ml	1,10 ml ddH ₂ O
	1,70 ml	2,50 ml Acrylamidlösung
	1,30 ml	1,30 ml Tris-HCl (pH 8,8)
	0,05 ml	0,05 ml 10% (w/v) SDS-Lösung
	0,05 ml	0,05 ml 10% (w/v) APS
	2,00 μ l	2,00 μ l TEMED

<u>Elektrophoresepuffer:</u>	25,00 mM	Tris-Base
	192,00 mM	Glycin
	0,10% (w/v)	SDS
<u>5× Probenpuffer:</u>	312,50 mM	Tris-Base (pH 6,8)
	50,00 mM	DTT
	10,00% (w/v)	SDS
	50,00% (v/v)	Glycerin
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen des Typs Protean II (Biorad) mit 0,75 mm dicken Spacern verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 1/5 Volumen 5× Probenpuffer versetzt und fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht. Als Molekulargewichtsstandard diente der vorgefärbte PageRuler (Fermentas).

Die Proben wurden bei konstant 30 mA pro Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt oder für den Western Blot verwendet.

3.7.4 Färbung von Proteinen in PA-Gelen

<u>Coomassie-Färbelösung:</u>	0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250
	40,0% (v/v)	Methanol
	10,0% (v/v)	Eisessig

Um die aufgetrennten Proteine im PA-Gel sichtbar zu machen, wurden diese mit dem Coomassie-Farbstoff angefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung für 30 sec in einer Mikrowelle aufgeköcht und für 10-20 Minuten auf einem Schwenktisch (WT12, Biometra) bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfärben wurden die Gele in dH₂O in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf dem Schwenktisch (WT12, Biometra) bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben.

3.7.5 Western Blot

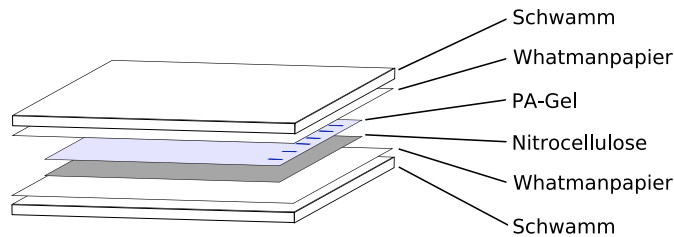
3.7.5.1 Transfer von Proteinen

<u>Blottingpuffer:</u>	25,0 mM	Tris-Base
	200,0 mM	Glycin
	20,0% (v/v)	Methanol

Mit Hilfe des Western Blots lassen sich Proteine spezifisch nachweisen. Dazu wurden die Proteine zuerst entsprechend ihres Molekulargewichtes auf einem Polyacrylamid-Gel

(Kapitel 3.7.3) aufgetrennt und danach auf eine Membran transferiert. Der Proteintransfer wurde mit einer Tankblot-Apparatur (Biorad) und Nitrocellulosemembranen (Biorad) durchgeführt.

Dazu wurde das Gel und die Membran kurz in Blottingpuffer äquilibriert und anschließend luftblasenfrei nach dem folgenden Schema in der Kassette zusammengebaut:



Die Kassette wurde verschlossen und in den Halter eingesetzt, so dass die Membran zur Anode zeigte. Um übermäßige Wärmeentwicklung zu vermeiden, wurde der Transferpuffer auf 4°C vorgekühlt und ein Eisblock in den Tank eingesetzt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 100 V.

3.7.5.2 Färbung von Proteinen auf Membranen

Ponceaurot-Färbelösung: 2% (w/v) Ponceau S
 3% (w/v) Trichloressigsäure

Eine Methode um die Proteine auf der Blotmembran nach dem Transfer sichtbar zu machen, stellt die Ponceaurot-Färbung dar. Diese Färbung ist reversibel und erlaubt eine anschließende Immunfärbung. Die Proteine werden durch die Trichloressigsäure gleichzeitig auf der Membran fixiert. Die Nachweisgrenze liegt bei > 50 ng/Bande.

Der Blot wird 1-2 Minuten bei Raumtemperatur in der Ponceaurot-Lösung inkubiert und der überschüssige Farbstoff durch Waschen mit Wasser entfernt. Die vollständige Entfärbung der Proteinbanden auf der Membran erfolgte ebenfalls in Wasser.

3.7.5.3 Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

TBS-T: 20,0 mM Tris-HCl (pH 7,6)
 137,0 mM NaCl
 0,1% (v/v) Tween 20

Die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-T mit 5% Magermilch abgesättigt und anschließend dreimal mit TBS-T für 5 min gewaschen. Die Membran wurde danach mit dem primären Antikörper, der in TBS-T mit 3% BSA verdünnt wurde, für eine

Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wurde der Blot mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper (verdünnt in TBS-T mit 5% Magermilch) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde während der gesamten Inkubation geschwenkt (WT12, Biometra).

Nach erneutem Waschen für 3 × 5 min in TBS-T erfolgte der Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz. Dabei handelt es sich um ein hochsensitives Nachweisverfahren bei dem durch Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H₂O₂ durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase Licht freigesetzt wird. Die Signale werden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Es wurde das ECL-Kit der Firma GE Healthcare verwendet. Die beiden Komponenten wurden gemäß den Herstellerangaben gemischt und die Membran wurde für eine Minute bei Raumtemperatur mit der ECL-Lösung inkubiert und danach in Frischhaltefolie eingeschlagen. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm, GE Healthcare) auf der Membran exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte in Entwickler- und Fixierlösung (Kodak) nach Angabe des Herstellers. Die entwickelten Filme wurden nach dem Trocknen mit einem ScanJet 6100C/T (Hewlett Packard) digitalisiert und die Intensität der Banden gegebenenfalls mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) quantifiziert.

3.7.6 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin (pH 3,0)

Neutralisierungspuffer: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

Die Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern, die in Kaninchen hergestellt wurden, erfolgte über eine Protein A-Säule (Pharmacia). Dabei wird die Tatsache genutzt, dass Antikörper reversibel über ihre Fc-Domäne an Protein A von *S. aureus* binden, das kovalent an das Säulenmaterial gekoppelt war.

Die Protein A-Säule wurde mit PBS gewaschen und 5 ml Kaninchen-Serum wurde auf die Säule gegeben. Die Säule wurde wieder mit PBS gewaschen, bis keine Änderung der OD₂₈₀ mehr messbar war (Durchflussphotometer, Pharmacia). Die Antikörper wurden mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt. Um den Elutionspuffer zu neutralisieren, wurden in die Probenröhrchen 100 µl Neutralisierungspuffer vorgelegt.

Die Antikörperkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde durch Messung der OD bei 280 nm bestimmt (siehe Kapitel 3.7.2.2). Fraktionen mit ähnlichen Absorptionen wurden gepoolt und die Antikörper anschließend bei -20°C gelagert.

3.7.7 Bestimmung der Rac1-Aktivität

<u>Bakterienlysepuffer:</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	20%	(w/v)	Saccharose
	10%	(v/v)	Glycerin
	2	mM	MgCl ₂
	2	mM	DTT
	2	mM	PMSF

<u>Präzipitationspuffer:</u>	50	mM	Tris-HCl (pH 7,4)
	100	mM	NaCl
	1%	(v/v)	NP-40
	10%	(v/v)	Glycerin
	2	mM	MgCl ₂
	2	mM	PMSF

MiniComplete Protease Inhibitor Mix (ROCHE)

PMSF und der Protease-Inhibitormix wurde den Puffern kurz vor dem Experiment frisch zugesetzt.

3.7.7.1 Überexpression von GST und GST-CRIB

20 ml LB-Medium in einem 50 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 20 µl Ampicillin-Stocklösung versetzt und mit 10 µl Bakterien (siehe Tabelle 3.2) aus einem Glycerolröhrchen beimpft. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C und 140 rpm auf einem Schüttelinkubator (Infors).

1 l LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen (2 l) wurde mit 1 ml Ampicillin-Stocklösung versetzt und mit 5 ml der Vorkultur angeimpft. Die Bakterien wurden schüttelnd bei 37°C und 140 rpm für 1,5 Stunden kultiviert. Die Produktion der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (1 M Stocklösung) induziert. Die Kulturen wurden für weitere zwei Stunden schüttelnd inkubiert.

Danach wurden die Bakterien bei 4°C und $23.000 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert (RC-5 mit SLA3000-Rotor, Sorvall), die Pellets in 50 ml Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.7.7.2 Infektion von HUVEC mit *S. pyogenes* A128

Um die Aktivierung von Rac1 in *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC zu bestimmen, wurden die Zellen in gelatinebehandelten 6 cm Schalen ausgesät. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie zwei bis drei weitere Tage kultiviert. Vor der Infektion erfolgte

eine zweistündige Inkubation in EGM 2-Medium mit 0,1% FBS bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden anschließend nach dem in Kapitel 3.6.7.2 beschriebenen Protokoll infiziert. Nach den gewünschten Infektionszeiten wurden die Zellen mit eiskaltem PBS/1 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂ gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.7.3 Präzipitation von aktivem Rac1

Die wie in Kapitel 3.7.7.1 beschrieben hergestellten Bakterienpellets wurden aufgetaut und in 10 ml Bakterienlysepuffer resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mittels French Press (40K-Zelle, 2 ×, SLM Instruments). Anschließend wurden die Lysate 30 Minuten bei 4°C und 27.000 × g (RC-5 mit SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, mit 200 µl gewaschener Glutathion-Sepharose 4B (GE Healthcare) versetzt und eine Stunde im Überkopfschüttler (Rotatur SB3, Stuart) bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend viermal mit 10 ml Bakterienlysepuffer gewaschen und in 200 µl GST-Präzipitationspuffer resuspendiert. 20 µl wurden auf einem 10%igen PA-Gel (Kapitel 3.7.3 und Kapitel 3.7.4) aufgetragen, um die Bindung der Proteine an die Glutathion-Sepharose zu analysieren.

Die infizierten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 150 µl Präzipitationspuffer versetzt und mit einem Zellschaber von der Platte geschabt. Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate fünf Minuten bei 15.000 × g und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf), um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 10 µl wurden zur Proteinbestimmung abgenommen (siehe Kapitel 3.7.2.1). Die Proteinmengen wurden normalisiert und 15 µl als Ladekontrolle abgenommen. Diese wurde mit 5× Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgekocht und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Lysate wurden anschließend mit 20-30 µl der Beadsuspension versetzt und 45 Minuten bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Präzipitationspuffer wurden die Proteine durch Zugabe von 20 µl 2× Probenpuffer und 5minütiger Inkubation bei 95°C eluiert.

3.7.7.4 Nachweis von Rac1 im Western Blot

Die aufgekochten Proben wurden auf 15%igen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Rac1 wurde anschließend mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.7.3 und 3.7.5).

3.8 Elektronenmikroskopie

<u>Cacodylatpuffer:</u>	100 mM	Cacodylat (pH 6,9)
	90 mM	Saccharose
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
<u>Fixierpuffer:</u>	2% (w/v)	Glutaraldehyd
	5% (w/v)	Formaldehyd
		in Cacodylatpuffer
<u>TE:</u>	20 mM	Tris-HCl (pH 7,0)
	2 mM	EDTA

Die auf Deckgläschen gewachsenen Zellen für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden nach den entsprechenden Infektionszeitpunkten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend im Fixierpuffer für eine Stunde auf Eis fixiert. Nach mehreren Waschschritten mit TE-Puffer wurden die Proben in einer aufsteigenden Serie mit Aceton (10%, 30%, 50%, 70%, 100%) auf Eis für jeweils 15 min entwässert. Danach wurden die Proben in flüssigem CO₂ einer kritischen Punkttrocknung unterzogen und mit einer ca. 10 nm dicken Goldschicht bedampft. Die Proben wurden mit einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (FESEM, Gemini DSM982, Zeiss) mit einer Beschleunigungsspannung von 5 kV untersucht. Die Präparation der Proben und die Untersuchung im Elektronenmikroskop erfolgte durch Dr. Manfred Rohde (Helmholtz HZI, Abteilung Mikrobielle Pathogenität).

3.9 Digitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einigen Modifikationen wie bei Herzog *et al.* beschrieben durchgeführt [66]. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen, sogenannter Fluorochrome, mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dadurch kommt es zur Emission von Licht mit einer größeren Wellenlänge durch die Fluorochrome, d.h. sie beginnen zu fluoreszieren. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden an Antikörper oder andere Proteine gekoppelt. Außerdem ist es möglich, bestimmte zelluläre Proteine mit fluoreszierenden Proteinen, bspw. dem grünfluoreszierenden Protein (GFP), zu fusionieren und in den Zellen zu exprimieren. Dadurch ist es möglich, bestimmte Proteine oder Strukturen in den Zellen zu lokalisieren. In dieser Arbeit

kam sowohl die Epifluoreszenzmikroskopie als auch die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz.

3.9.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Die Anregung der Fluorochrome erfolgt bei der Epifluoreszenzmikroskopie mit Hilfe einer Quecksilber-Hochdruckdampflampe. Im Mikroskop befinden sich mehrere Sperrfilter und ein dichroitischer Spiegel, die es ermöglichen, Licht bestimmter Wellenlängen zur Probe zu lenken und das emittierte Licht entweder zum Okkular oder zu einer CCD-Kamera zu leiten.

Filterset	Anregung	Emission	Fluorochrom
Nr. 02	G 365	LP 420	DAPI, Filipin
Nr. 9	BP 450-490	LP 515	Alexa Fluor® 488, EGFP
Nr. 15	BP 546/12	LP 590	Alexa Fluor® 568

Tabelle 3.6: Verwendete Filtersätze in der Epifluoreszenzmikroskopie. Die Anregungs- und Emissions-Charakteristika der Filtersätze sowie die damit visualisierten Fluorochrome sind angegeben.

Es wurde ein Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100 mit 50 W Quecksilber-Hochdruckdampflampe und Halogenlampe sowie einem manuell verstellbaren Filterschlitten verwendet. Es wurden die folgenden Immersionsölobjektive mit einer hohen numerischen Apertur (NA) eingesetzt: 63× 1,25 NA Plan-Neofluar und 100× 1,3 NA Plan-Neofluar (Zeiss). Das verwendete Immersionsöl (Immersol 518N, Zeiss) hatte einen Brechungsindex von 1,518. An das Mikroskop war eine Axiocam HRc (Zeiss) gekoppelt. Die Steuerung der Kamera erfolgte mit der AxioVision Software (Zeiss). Die einzelnen Kanäle wurden mit den entsprechenden Filtern (siehe Tabelle 3.6) getrennt aufgenommen.

3.9.2 Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird die Probe mit einem fokussierten Laserstrahl gescannt, woraus sich auch die englische Bezeichnung *confocal laser scanning microscopy (clsm)* ableitet. Die Verwendung einer verstellbaren Lochblende (oder Iris) vor dem Detektor ermöglicht das Eliminieren von Licht, das nicht in der Fokusebene liegt. Dadurch wird nicht nur eine verbesserte Auflösung erzielt, sondern es ist auch möglich, einzelne optische Ebenen aufzunehmen und daraus eine dreidimensionale Darstellung des Objektes zu erzeugen.

Bei dem verwendeten konfokalen System handelte es sich um ein MRC-1024 System (Biorad) mit einem Krypton-Argon-Mischgaslaser, das an ein inverses Axiovert 100TV Mikroskop (Zeiss) montiert war. Es wurden die folgenden Ölimmersionsobjektive verwendet: 63× 1,25 NA Plan-Neofluoar und 100× 1,3 NA Plan-Neofluar (Zeiss). Das verwendete Immersionsöl (Immersol 518N, Zeiss) hatte einen Brechungsfaktor von 1,518. Das gesamte System wurde durch die Lasersharp2000-Software (Biorad) gesteuert. Die Detektion der emittierten Photonen erfolgte mit drei, im Scanner-Kopf befindlichen Sekundärelektronenverstärkern, im Englischen *photo multiplier tube* (PMT) genannt. Das MRC-1024-System besitzt drei PMTs sowie einen Transmissionsdetektor, die die simultane Aufnahme von bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und des Phasenkontrastbildes ermöglichen. Es wurden die folgenden Systemeinstellungen verwendet:

<u>Zweifach-Fluoreszenz:</u>	Laserstärke: 30% Filterposition 1: 488/568/647 nm dreifacher, dichroitischer Filter (T1-Block) Filterposition 2: 560 nm dichroitischer LP-Filter (E2-Block) PMT1: 568 nm Laserlinie mit 585LP Emissionsfilter PMT2: 488 nm Laserlinie mit 540/30 Emissionsfilter
<u>Dreifach-Fluoreszenz:</u>	Laserstärke: 30% Filterposition 1: 488/568/647 nm dreifacher, dichroitischer Filter (T1-Block) Filterposition 2: 560 nm dichroitischer LP-Filter (E2-Block) PMT1: 568 nm Laserlinie mit 585LP Emissionsfilter PMT2: 488 nm Laserlinie mit 540/30 Emissionsfilter PMT3: 647 nm Laserlinie mit 680DF32 Emissionsfilter
<u>Transmission:</u>	Laserstärke: 100% Filterposition 1: 488/568/647 nm dreifacher, dichroitischer Filter (T1-Block) TLD: 488 nm, 568 nm und 647 nm Laserline

Die Irisöffnung wurde der Stärke der Fluoreszenzsignale angepasst. Die Signale der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden simultan detektiert. Es wurden Aufnahmen von mehreren optische Ebenen mit einer Schrittweite von 0,18 µm oder 0,36 µm aufgenommen.

3.9.3 Digitale Bildverarbeitung

Die weitere Bildverarbeitung erfolgte mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) auf einem IBM Thinkpad T42 unter Debian Linux 2.4.

Es wurden Kontrast- und Helligkeitsanpassungen durchgeführt und bei Mehrfachmarkierungen fixierter Zellen die Bilder der einzelnen Kanäle übereinander gelegt (Merge). Darüber hinaus ist es möglich, Signale, die von außerhalb des Schärfetiefenbereichs kommen, durch mathematische Berechnungen zu entfernen. Dadurch wird eine Verbesserung des Kontrastes erreicht. Zur Berechnung werden verschiedene Parameter wie bspw. Wellenlänge des Lichtes, numerische Apertur des verwendeten Objektives, Pixelgröße und Brechungsindex des Immersionsöls herangezogen, die für die jeweiligen Aufnahmebedingungen angepasst werden müssen.

Es wurde ein iterativer Algorithmus im 2D-Modus in Verbindung mit einem theoretischen PSF verwendet (OptiNav, <http://www.optinav.com/imagej.html>). Alle Epifluoreszenzaufnahmen wurden auf diese Weise prozessiert.

3.9.4 Fluoreszenzfärbung fixierter Zellen

<u>Zytoskelett-Puffer (ZSP):</u>	10 mM	MES (pH 6,1)
	150 mM	NaCl
	5 mM	EGTA
	5 mM	MgCl ₂
	5 mM	Saccharose
<u>Blocking-Puffer:</u>	1% (w/v)	BSA
	5% (v/v)	Pferdeserum
	in PBS	

Die Visualisierung von Proteinen bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgt durch Bindung eines primären Antikörpers an das Zielprotein, der mit einem sekundären Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, sichtbar gemacht wird. Da mehrere sekundäre Antikörper an den Primärantikörper binden können, wird eine hohe Sensitivität erreicht. Darüber hinaus ist es auch möglich, Proteine direkt mit einer fluoreszierenden Markierung, wie beispielsweise GFP zu versehen.

Um Aussagen über die Lokalisation der Bakterien und der zellulären Proteine machen zu können, wurden die Proben zunächst mit 3% Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Paraformaldehyd legt die Proteinstrukturen von Bakterien und Zellen fest. Damit die Antikörper in die Zellen gelangen können, wurden diese mit dem Detergenz Triton X-100 permeabilisiert.

Für spezielle Untersuchungen des zellulären Zytoskeletts wurden die Zellen zweimal mit einem zytoskelettstabilisierenden Puffer (ZSP) gewaschen und anschließend in ZSP mit

3% Paraformaldehyd und 0,1% Glutaraldehyd für 15 min fixiert. Die Zellen wurden nach der Fixierung zweimal mit ZSP gewaschen.

Im Anschluss wurden die fixierten Zellen 2×10 min mit PBS/10 mM Glycin bei Raumtemperatur gewaschen, um noch freie, reaktive Gruppen abreagieren zu lassen.

3.9.4.1 Differentielle Fluoreszenzfärbung von Streptokokken

Die differentielle Fluoreszenzfärbung von Streptokokken mit zwei unterschiedlichen Sekundärantikörpern ermöglicht die Unterscheidung von intrazellulären und extrazellulären Bakterien in einem Infektionsversuch.

Die Deckgläschen mit den infizierten und fixierten Zellen wurden dazu aus den Zellkulturschalen entnommen und auf ein Stück Parafilm in einer mit Aluminiumfolie eingeschlagenen Plastikbox gelegt. Die Seite mit den Zellen zeigte dabei nach oben. Um das Austrocknen der Proben zu vermeiden, befand sich unter dem Parafilm ein mit Wasser getränktes Stück Whatman-Papier. Um eine unspezifische Bindung der eingesetzten Antikörper zu verhindern, wurden die Proben für 20 min mit 20 μ l Blocking-Puffer inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l des primären Anti-GAS-Antikörpers auf das Deckgläschen getropft und für 30 min inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Proben wurden mit den sekundären Antikörpern für 30 min inkubiert. In diesem Schritt wurden nur die extrazellulären Streptokokken gefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit PBS/0,1% Triton X-100 für 5 min permeabilisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Dadurch sind im Folgenden auch die intrazellulären Streptokokken für die Antikörper zugänglich.

Die Proben wurden erneut mit 20 μ l des Anti-GAS-Antikörpers für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 20 μ l des Sekundärantikörpers, der allerdings mit einem anderen Fluorochrom konjugiert war, für 30 min zugegeben. Die Proben wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und umgekehrt auf einen Tropfen ProLong® Gold (Molecular Probes) fixiert und mit Nagellack versiegelt.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Aufnahmen der Proben wurden wie in Kapitel 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben angefertigt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Zur Quantifizierung intra- und extrazellulärer Streptokokken mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden jeweils 50 Zellen in mindestens 5 verschiedenen, zufällig ausgewählten Ausschnitten in drei unabhängigen Experimenten evaluiert.

3.9.4.2 Fluoreszenzfärbung von Streptokokken und Zellkomponenten

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Streptokokken und zellulären Komponenten wurden die fixierten Zellen als erstes mit PBS/0,1% Triton X-100 für 5 min permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte wieder eine 20minütige Inkubation mit 20 µl Blocking-Puffer, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Die Proben wurden danach wie im vorherigen Kapitel beschrieben mit den entsprechenden Primär- und Sekundäranantikörpern inkubiert. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3.3 und 3.4 aufgelistet. Diese indirekten Färbemethoden wurden zum Teil mit den im Folgenden beschriebenen direkten Fluoreszenzfärbungen kombiniert. Die Proben wurden wieder dreimal mit PBS gewaschen und umgekehrt auf einen Tropfen ProLong® Gold (Molecular Probes) fixiert und mit Nagellack versiegelt.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Aufnahmen der Proben wurden wie in Kapitel 3.9.1 und 3.9.2 beschrieben angefertigt. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

Färbung von F-Aktin

Zur Färbung von filamentösem Aktin wurde fluoreszenzmarkiertes Phalloidin benutzt. Dieses Toxin des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* lagert sich seitlich an filamentöses Aktin an und verhindert dabei dessen Depolymerisierung. Es wurden folgende Phalloidinkonjugate eingesetzt:

- Alexa Fluor® 488-konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes)
- Alexa Fluor® 568-konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes)

Die Phalloidinkonjugate wurden 1:300 in PBS/1% BSA verdünnt und die Zellen für 20 min mit der Lösung inkubiert.

Färbung von Cholesterin

Zur Darstellung von zellulärem Cholesterin wurde das Polyen-Antibiotikum Filipin (Sigma) verwendet. Die fixierten Zellen wurden für 30 min mit 50 µg ml⁻¹ Filipin in PBS inkubiert.

Färbung von DNA

Zur Färbung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptionsmaximum sich nicht im UV-Bereich befindet, wurde der Farbstoff Syto-13 (Molecular Probes) verwendet. Dazu wurden die Zellen im ersten Schritt wie oben beschrieben permeabilisiert und

danach zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 450 µl PBS und 50 µl DNase-freie RNase (Stocklösung: 10 mg ml⁻¹, AppliChem) zu den fixierten Proben gegeben und über Nacht inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben 15 min mit 1 µM Syto-13 in PBS gefärbt und wiederum zweimal mit PBS gewaschen.

Die Färbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI erfolgte durch Verwendung des Einbettungsmediums ProLong® Gold (Molecular Probes) nach Angaben des Herstellers.

3.9.4.3 Quantifizierung des phagolysosomalen LAMP1-Erwerbs

Zur Quantifizierung des phagolysosomalen LAMP1-Erwerbs wurden HUVEC mit *S. pyogenes* A128 wie in Kapitel 3.6.7.1 beschrieben infiziert und LAMP1 sowie die Streptokokken mit Antikörpern gefärbt (Kapitel 3.9.4.2). Mit LAMP1-kolokalisierende Phagolysosomen wurden aufgrund strikter morphologischer Merkmale, wie bei Bothelo *et al.* beschrieben, bestimmt [18]. GAS-enhaltende Phagosomen in inhibitorbehandelten Zellen bzw. in Kontrollzellen wurden als positiv bewertet, wenn sie eine vollständige LAMP1-Ringfluoreszenz aufwiesen. Es wurden 200 Zellen in mindestens 10 verschiedenen, zufällig ausgewählten Ausschnitten in drei unabhängigen Experimenten untersucht. Parallel dazu wurde die Wirkung des Inhibitors auf die Anzahl der intrazellulären Bakterien untersucht.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm R, Version 2.3.0 (<http://www.r-project.org>). Um die Daten auf Signifikanz zu testen wurde der Students *t*-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in HUVEC

4.1.1 Bildung von Membranprotrusionen

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass GAS-Stämme des Serotyps M3 in der Lage sind, hocheffizient an Endothelzellen zu binden, und in diese internalisiert werden. Das traf sowohl für Endothelzellen makrovaskulären Ursprungs (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) als auch für mikrovaskuläre Endothelzellen (*human microvascular vein endothelial cells*, HMVEC) zu. Die Internalisierung geht mit der Bildung von Membranausstülpungen, die sich über die Bakterien schieben und der Akkumulation von Aktin in der unmittelbaren Nähe der Bakterien einher (M. Rohde und S. Talay, unveröffentlicht; N. Petermann, Diplomarbeit 2003).



Abbildung 4.1: Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in Endothelzellen. HUVEC wurden mit *S. pyogenes* A128 infiziert und nach 30 Minuten fixiert. Intra- und extrazelluläre Streptokokken wurden mit einem polyklonalen Antikörper und entsprechenden sekundären Antikörpern differentiell angefärbt. Extrazelluläre Streptokokken sind in gelb dargestellt, die intrazellulären Streptokokken in rot (A). In B ist eine Vergrößerung einer Streptokokkenkette, die gerade aufgenommen wird, gezeigt. Der Maßstab entspricht 15 µm in A bzw. 5 µm in B.

Die Internalisierung von *S. pyogenes* A128 ist in Abbildung 4.1 A exemplarisch dargestellt. HUVEC wurden mit GAS A128 infiziert und nach 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden erst die extrazellulären Bakterien mit einem polyklonalen Antikörper gegen Strepto-

kokken und Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. Nach der Permeabilisierung der Zellmembran wurden, neben den schon gefärbten extrazellulären Bakterien, auch die intrazellulären Bakterien mit einem Anti-GAS-Antikörper und sekundären Alexa 568-konjugierten Antikörpern gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop erschienen extrazelluläre Bakterien aufgrund der Überlagerung von roter und grüner Fluoreszenz in gelb, während intrazelluläre Bakterien nur rot fluoreszierten. Abbildung 4.1 B zeigt die Vergrößerung einer Streptokokkenkette, die schon zum Teil internalisiert wurde.

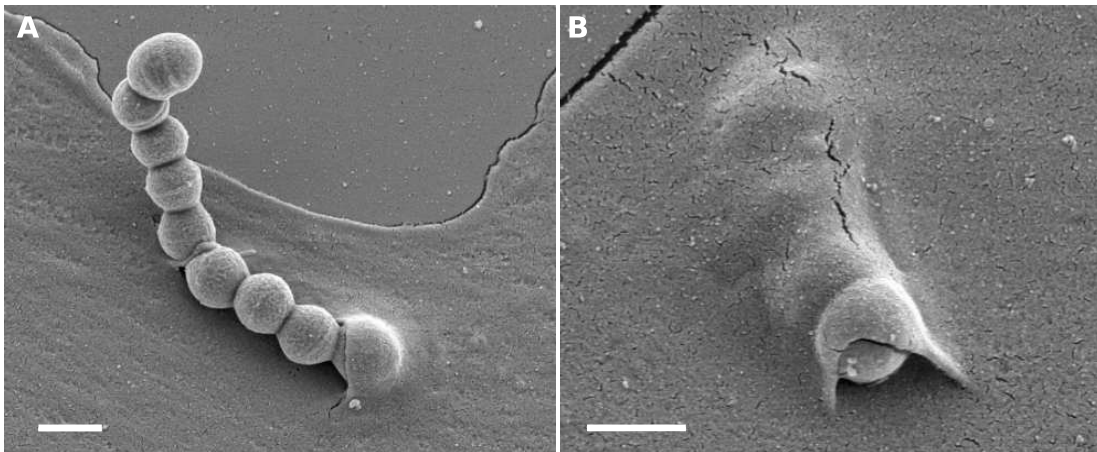


Abbildung 4.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Internalisierung von *S. pyogenes* A128. HUVEC wurden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Nach der Fixierung und entsprechender Prozessierung wurden FESEM-Aufnahmen angefertigt. In **A** ist der Beginn des Aufnahmeprinzesses gezeigt, während die Bakterien in **B** fast vollständig aufgenommen wurden. Der Maßstab entspricht 1 μm .

Die protrusiven Membranausstülpungen, die während des Aufnahmeprinzesses gebildet werden, sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Gezeigt ist der Beginn des Aufnahmeprinzesses (**A**) sowie dessen Abschluss (**B**). Der enge Kontakt zwischen den Bakterien und der sich über sie schiebenden Membran deutet auf einen sog. *zipper*-Mechanismus hin, wie er bspw. für die Internalisierung von *Yersinia* spp. beschrieben wurde.

4.1.2 Akkumulation von Aktin und α -Actinin

Die Bildung protrusiver Membranausstülpungen basiert auf der regulierten Rekrutierung von Gerüstbausteinen an die Spitze der Protrusion und der Polymerisation zu Aktinfilamenten. Die Polymerisation muss dabei eng mit der Stabilisierung der Filamente durch quervernetzende Faktoren verbunden sein, um eine gewisse Stabilität zu gewährleisten. Einer der Kandidaten für die Quervernetzung von Aktinfilamenten, der in Lamelliopodien und Filopodien zu finden ist, ist α -Actinin [89].

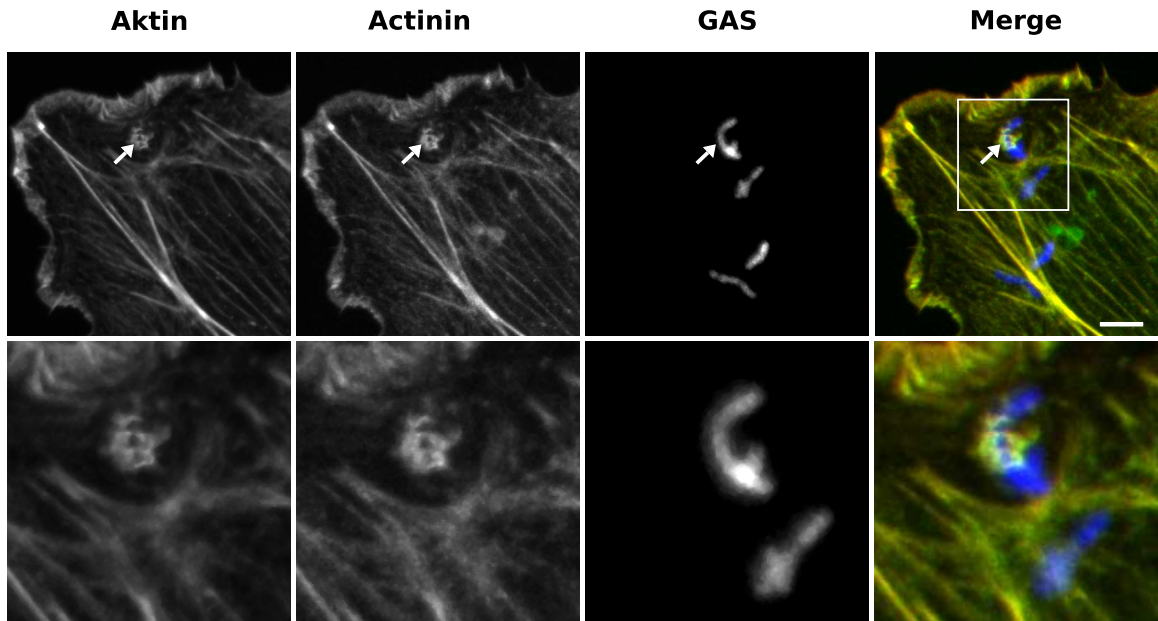


Abbildung 4.3: Lokalisation von *S. pyogenes* A128 mit Aktin und α -Actinin. HUVEC wurden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 (GAS) infiziert und anschließend fixiert. Die Streptokokken wurden mit polyklonalen Anti-GAS-Antikörpern und Cy5-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. α -Actinin wurde mit einem monoklonalen Antikörper und Alexa 488-konjugierten Sekundärantikörpern, Aktin durch Inkubation mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Die Pfeile markieren die lokale Rekrutierung von Aktin und α -Actinin in der Umgebung einer Streptokokken-Kette. Die untere Reihe zeigt eine Vergrößerung des in der Überlagerung der einzelnen Kanäle (Merge) markierten Bereichs. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Die Akkumulation von Aktin und α -Actinin in *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC wurde durch Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen α -Actinin und entsprechenden Sekundärantikörpern bzw. mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin durch konfokale Mikroskopie nachgewiesen. Die Streptokokken wurden mit polyklonalen Anti-GAS-Antikörpern und Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt.

Abbildung 4.3 zeigt, dass die Akkumulation von Aktin mit einer Rekrutierung von α -Actinin einherging (Pfeile), welches eine stabilisierende Funktion für die Aktinfilamente hat. Eine ähnlich starke Akkumulation beider Proteine war an den Randbereichen der Zelle zu beobachten. Diese Strukturen weisen auf Bewegungsvorgänge (Lamellipodien, Filopodien) hin, die auch bei der Aufnahme der Streptokokken in die Zellen eine Rolle zu spielen scheinen. Die molekularen Ereignisse in der Wirtszelle, die zur Bildung dieser Strukturen führten sollten im Folgenden genauer untersucht werden.

4.1.3 Entwicklung eines synchronisierten Infektionsprotokolls

Wie in den Abbildungen 4.3 zu sehen ist, kommt es nur während bestimmter Phasen der Infektion zu einer Akkumulation von Aktin und der damit einhergehenden Bildung der Membranprotrusionen. Es kann außerdem davon ausgegangen werden, dass die Signalprozesse, die diese Vorgänge regulieren, ebenfalls nur während dieser Phasen aktiviert werden. Dies bedeutet, dass die Aktivierungen der verschiedenen Signalmoleküle während einer Infektion, wie sie in Abbildung 4.3 dargestellt ist, nicht messbar ist (Daten nicht gezeigt). Um dieses Problem zu lösen, wurde ein synchronisiertes Infektionsprotokoll etabliert. Eine oft genutzte Methode ist die Infektion mit anschließender Zentrifugation, die alle Bakterien in Kontakt mit den Zellen bringt. Der Nachteil dieser Methode bestand jedoch in den starken Nebeneffekten auf die Zellen wie zum Beispiel der Depolymerisierung des Zytoskelett und der Aktivierung der GTPase Rac1 unmittelbar nach der Zentrifugation (Daten nicht gezeigt).

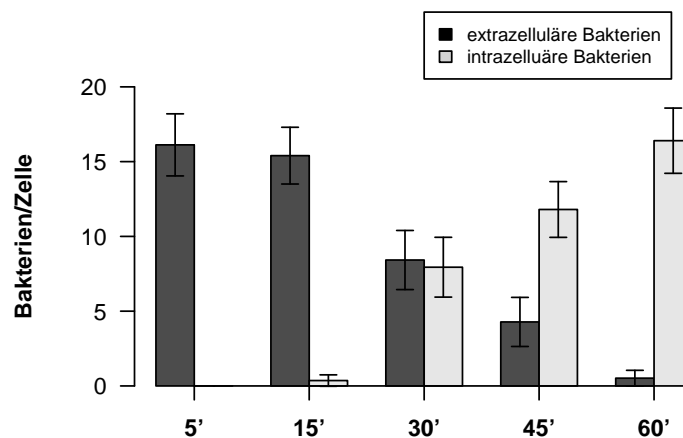


Abbildung 4.4: Synchronisierung der Infektion mit *S. pyogenes* A128. HUVEC wurden mit *S. pyogenes* A128 für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen auf 37°C gebracht und für die angegebenen Zeiten infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine differentielle Färbung extra- und intrazellulärer Streptokokken. Die Daten zeigen die Anzahl extra- und intrazellulärer Bakterien pro Zelle von einem repräsentativen Experiment (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 50$ Zellen).

Um diese zentrifugationsbedingten Effekte zu umgehen, wurden die Zellen kurz vor der Infektion auf Raumtemperatur gebracht, wobei es zu einer Phasenverschiebung in der Zellmembran hin zu einem eher kristallinen Zustand kam. Anschließend wurden die Zellen mit *S. pyogenes* A128 (MOI = 50) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bindung der Streptokokken an die Zellen zu ermöglichen. Nach zweimaligem Waschen mit Medium um die nichtgebundenen Bakterien zu entfernen, wurden die Zellen auf 37°C gebracht, was die Zellmembran wieder in einen fluiden Zustand versetzte,

in dem die Aufnahme der Bakterien möglich war. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Zellen fixiert und extra- sowie intrazelluläre Bakterien mit polyklonalen Anti-GAS-Antikörpern sowie den entsprechenden sekundären Antikörpern differentiell angefärbt (vgl. Abbildung 4.1) und die Anzahl von intra- und extrazellulären Bakterien wurde quantifiziert.

Abbildung 4.4 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes zur Validierung des Synchronisationsprotokolls. Die mittlere Anzahl adhärenter Streptokokken lag nach der zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur bei ca. 15 Bakterien pro Zelle (MOI = 15). Die Internalisierung der Streptokokken begann 15 Minuten nach der Erhöhung der Temperatur auf 37°C. Nach 45 Minuten befanden sich bereits über 70% der gebundenen Bakterien in den Zellen. Nach einer Stunde war der Aufnahmeprozess vollständig abgeschlossen.

Zeit [min]	Aktin-Akkumulations- ereignisse/Zelle
5	0.0 ± 0.0
15	0.1 ± 0.2
30	1.7 ± 0.4
45	1.1 ± 0.4
60	1.1 ± 0.4

Tabelle 4.1: Aktin-Akkumulationsereignisse während der synchronisierten Infektion mit *S. pyogenes*. HUVEC wurden mit *S. pyogenes* A128 nach dem Synchronisationsprotokoll infiziert. Nach der Fixierung erfolgte eine Färbung der Streptokokken und des F-Aktins. Die Daten zeigen die Anzahl der Aktin-Akkumulationsereignisse pro Zelle von einem repräsentativen Experiment (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 50 Zellen).

Um zu überprüfen, inwieweit damit auch eine Synchronisierung der Aktin-Akkumulation zu erreichen war, wurde in parallel infizierten Proben das filamentöse Aktin mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Untersucht wurde die Akkumulation von Aktin (vgl. Abbildung 4.3) in der Umgebung von allen zellassozierten Streptokokken-Ketten in 50 Zellen. Dabei konnte eine maximale Aktin-Akkumulation nach 30 Minuten beobachtet werden (Tabelle 4.1). Diese Akkumulationen konnten – auf einem niedrigeren Niveau – bis zum letzten untersuchten Zeitpunkt beobachtet werden. Trotz der anhaltenden Akkumulations-Ereignisse sollte mit diesem Protokoll jedoch eine Aktivierung von Signalen in den Wirtszellen messbar sein, da 50% der zellassozierten Bakterien innerhalb eines Zeitfensters von 15 Minuten (zwischen 15 und 30 Minuten) internalisiert wurden und dies mit der maximalen Aktinrekrutierung einherging.

4.2 Lipid rafts sind an der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 beteiligt

Lipid rafts sind Membranmikrodomänen, die sich aus Proteinen und Lipiden, insbesondere Glykosphingolipiden und Cholesterin, zusammensetzen. Diese Mikrodomänen sind in der Lage Signaltransduktions-Plattformen zu bilden, was auf ihrer Fähigkeit beruht verschiedene Proteine in lokal begrenzten Membranbereichen zusammenzuführen. Das Vorhandensein von Cholesterin in diesen Domänen beruht auf seiner Affinität zu gesättigten Fettsäuren, wie sie häufig in Glykosphingolipiden vorkommen [107]. Außerdem schirmen die Glykanstrukturen der Sphingolipide das unpolare Cholesterin gegen das wässrige extrazelluläre Milieu ab [70]. Mit Chemikalien, die die Homöostase und die Membranverfügbarkeit von Cholesterin verändern, sollten sich somit auch die Stabilität und das Vorhandensein der Membranmikrodomänen manipulieren lassen.

4.2.1 Die Cholesterin-Depletierung hemmt die Internalisierung

Cyclodextrine sind zyklische Glukoseoligomere (modifizierte Cyclo-Heptaamylose), die aufgrund ihrer substituierten Seitenketten wasserlöslich sind und in ihrer dreidimensionalen Form eine unpolare, hydrophobe Tasche ausbilden. Durch die räumliche Beschaffenheit und die Hydrophobizität der Tasche besitzt Methyl- β -Cyclodextrin ($M\beta CD$) eine hohe Bindungsaffinität zu Cholesterin und Cholesterinderivaten. Unbeladenes $M\beta CD$ ist in der Lage Cholesterin aus der Zellmembran herauszulösen und im wässrigen Milieu in Lösung zu bringen. Abhängig von der verwendeten Konzentration führt dies zu einer mehr oder weniger starken Cholesterin-Depletion der Zellmembranen [111, 128].

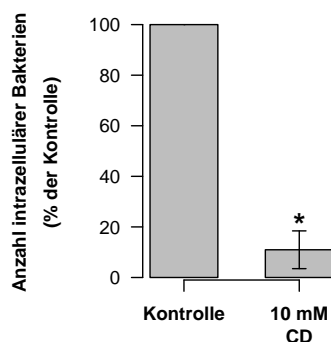


Abbildung 4.5: Quantitative Analyse der *S. pyogenes* A128-Internalisierung nach Methyl- β -Cyclodextrin (CD) Behandlung von HUVEC. Die Daten zeigen die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die Kontrolle (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$ Experimente). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Werten ist mit einem Stern markiert (* $p < 0,005$).

Um zu untersuchen, welche Rolle die cholesterinreichen Membranmikrodomänen während des Internalisierungsprozesses spielen, wurde das Cholesterin mit Hilfe von $M\beta CD$ spezifisch aus der Zellmembran depletiert. Die Zellen wurden mit 10 mM $M\beta CD$ für 30 Minuten inkubiert, um das Cholesterin aus der Zellmembran zu entfernen und die in-

trazellulären Bakterien wurden nach 60 Minuten Infektion quantifiziert. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, führt die Behandlung mit M β CD zu einer 90%igen Reduktion der intrazellulären Bakterien ($p < 0,005$). Dies zeigt die Wichtigkeit von funktionierenden Membranmikrodomänen für die Aufnahme von *S. pyogenes* in HUVEC.

4.2.2 Rekrutierung von *lipid raft*-Markern zur Internalisierungsstelle

Die Membranmikrodomänen bilden hinsichtlich ihrer Zusammensetzung keine homogene Gruppe, sondern unterscheiden sich insbesondere in ihrer Proteinzusammensetzung. Erst dieses Charakteristikum befähigt sie, als Signalplattformen für unterschiedliche extrazelluläre Signale zu fungieren. Typische *lipid raft*-Marker sind bspw. das Protein Caveolin 1 oder das Gangliosid G_{M1}. Rohde *et al.* [139] konnten zeigen, dass es zur Akkumulation von Caveolin-1 bei der Internalisierung von SfbI-exprimierenden Streptokokken kommt.

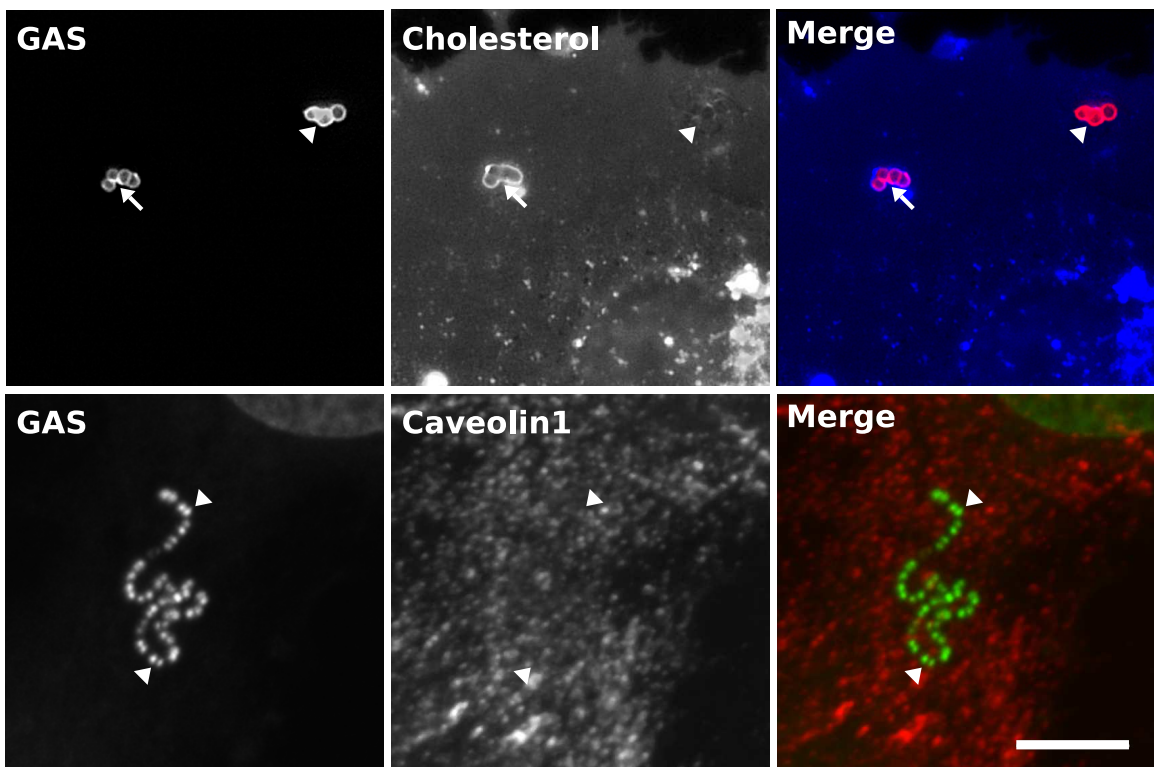


Abbildung 4.6: Lokalisation von *S. pyogenes* A128 mit *lipid raft*-Markern. HUVEC wurden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 (GAS) infiziert und anschließend fixiert. Das zelluläre Cholesterin wurde mit Filipin gefärbt. Caveolin 1 wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Caveolin 1 und Alexa 568-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Für die Lokalisation von Streptokokken und Caveolin 1 wurde die DNA der Streptokokken mit dem grünen Farbstoff Syto13 gefärbt. Die Pfeile markieren die lokale Akkumulation des Markerproteins in der unmittelbaren Nähe der Streptokokken. Die Pfeilspitzen zeigen Streptokokken, die keine Kolokalisation aufweisen. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Mittels Immunfluoreszenz wurden die beteiligten *lipid rafts* im Fall der M3-Streptokokken weitergehend charakterisiert. Dazu wurden HUVEC mit *S. pyogenes* A128 infiziert und mittels Fluoreszenzfärbung auf Kollokalisierung mit Cholesterin und dem Markerprotein Caveolin 1 untersucht. Um im Fall der Cholesterinfärbung Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Membranen durch Permeabilisierung mit Triton X-100 zu vermeiden, wurden die Zellen mit Alexa 568-markierten Streptokokken infiziert. Das Cholesterin wurde nach der Infektion mit Filipin, einem fluoreszierenden Polyen-Antibiotikum, das mit den freien 3β -Hydroxylgruppen des Cholesterins interagiert, gefärbt [108]. Wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, kam es zu einer Akkumulation von Cholesterin um die eindringenden bzw. internalisierten Bakterien (Pfeile), wohingegen extrazelluläre Bakterien nicht mit Filipin kollokalisieren (Pfeilspitzen).

Keine Akkumulation konnte hingegen im Fall von Caveolin nachgewiesen werden, obwohl sich die Bakterien in einer Ebene mit den Signalen für Caveolin, d. h. in den Zellen befanden. Ein weiterer traditioneller Marker für *lipid rafts* ist G_{M1} , das durch fluoreszenzmarkiertes Cholera-Toxin lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Die nicht-toxische B-Untereinheit dieses Toxins bindet dabei spezifisch an G_{M1} . Es war auf diesem Wege jedoch nicht möglich, die Membranmikrodomänen in HUVEC zu markieren (nicht dargestellt), da diese Zellen, wie Endothelzellen im allgemeinen, vorrangig G_{M3} aufweisen [106]. Diese Ergebnisse bestätigten die Beteiligung von cholesterinhaltigen Mikrodomänen während der Internalisierung von GAS A128. Bei diesen handelt es sich aber scheinbar nicht um Caveolae wie bei der SfbI-vermittelten Internalisierung.

4.2.3 Caveolae sind am Internalisierungsprozess nicht beteiligt

Wie schon in Abbildung 4.6 gezeigt, ist eine Akkumulation von Caveolin 1 um die Bakterien lichtmikroskopisch nicht zu beobachten. Caveolae sind Membraneinstülpungen mit einer flaschen- oder omega-ähnlichen Form, die eine Größe von 50-80 nm haben. Deshalb sind Caveolae - wie auch andere Membranmikrodomänen - nicht direkt mit lichtmikroskopischen Methoden nachweisbar. Lediglich nach Quervernetzung mit Antikörpern oder durch Pathogene ist es möglich, diese Mikrodomänen im Lichtmikroskop darzustellen. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Methoden besteht jedoch die Möglichkeit Caveolae aufgrund ihrer Form und Größe direkt auf der Zelloberfläche nachzuweisen.

Um zu bestätigen, dass bei der Internalisierung von M3-Streptokokken keine Caveolae beteiligt sind, wurde deshalb der Aufnahmeprozess auf der ultrastrukturellen Ebene im direkten Vergleich mit SfbI-exprimierenden Streptokokken untersucht. Wie in Abbildung 4.7 C und D zu sehen ist, kam es bei der SfbI-vermittelten Internalisierung (A 40) zu einer Akkumulation von Caveolae um die Bakterien. Das Insert in Abbildung 4.7 C zeigt diese

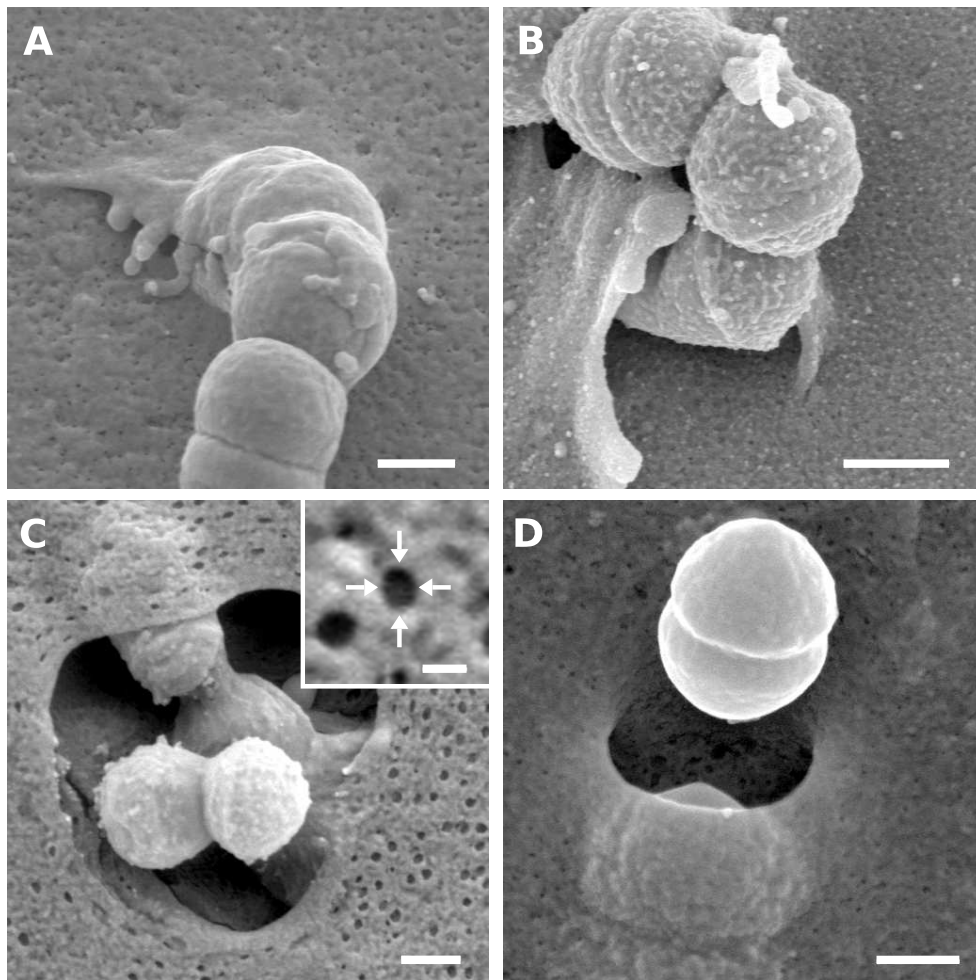


Abbildung 4.7: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Internalisierung von *S. pyogenes* A40 und A128. HUVEC wurden für 30 Minuten (A und B) bzw. 120 Minuten (C und D) infiziert. Nach der Fixierung und entsprechender Prozessierung wurden die Proben mittels FESEM analysiert. In A und B ist die Aufnahme von GAS A128 dargestellt, in C und D die Aufnahme von GAS A40. Das Insert in C zeigt eine Vergrößerung der kleinen Membraneinstülpungen, die um die Bakterien akkumulieren. Der Maßstab entspricht 500 nm bzw. 100 nm in dem Insert in C.

ca. 60 nm großen Einstülpungen in der Zellmembran genauer. Dieser Prozess resultierte in der Bildung von Einstülpungen in der Zellmembran, die zur Aufnahme der Bakterien führten.

Ein völlig anderes Bild ergab sich hingegen bei der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3. Hier kam es, wie schon in Abbildung 4.2 gezeigt, zur Bildung von Membranausstülpungen, die sich über die Streptokokken schoben. Eine Akkumulation von kleinen Einstülpungen, die aufgrund ihrer Größe als Caveolae identifiziert werden können, trat hier nicht auf. Diese Ergebnisse bestätigten die durch die lichtmikroskopischen Verfahren erhaltenen Befunde, die auf einen caveolaeunabhängigen Mechanismus der Aufnahme hindeuteten.

4.3 Die Funktion von Protein-Tyrosinkinasen während der Internalisierung von *S. pyogenes* A128

Während der Infektion mit den Streptokokken kommt es zu einer engen Bindung der Bakterien an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie sie für die *zipper*-ähnlichen Aufnahme-mechanismen typisch ist. Wie für die Invasion von *S. aureus* und *Y. pseudotuberculosis* in Epithelzellen gezeigt wurde, ist eine der ersten Antworten auf diese Interaktion die Aktivierung von verschiedenen PTKs [2, 45].

4.3.1 Die Aktivität von Protein-Tyrosinkinasen des Wirtes ist essentiell für die Internalisierung

Um die Rolle von zellulären PTKs während der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 zu untersuchen, wurde Genistein, ein allgemeiner Inhibitor von PTKs, verwendet. Die Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von Genistein für 60 Minuten präinkubiert und anschließend infiziert. Nach Fixierung und Fluoreszenzfärbung erfolgte die Quantifizierung der intrazellulären Streptokokken.

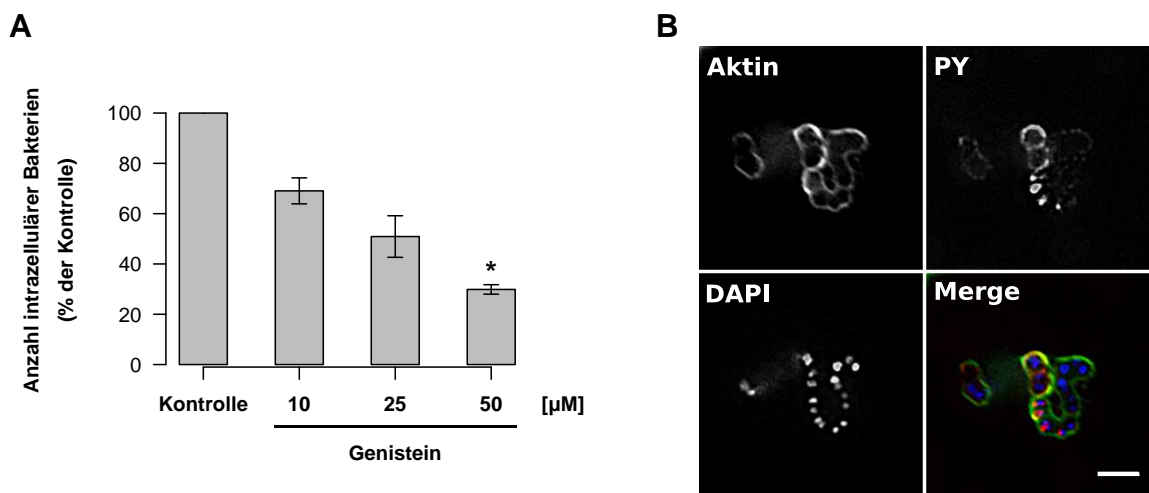


Abbildung 4.8: Effekt des Tyrosin-Kinaseinhibitors Genistein auf die Internalisierung von *S. pyogenes* A128 und Lokalisation mit Aktin und Phosphotyrosin (PY). (A) HUVEC wurden für 60 Minuten mit 10, 25 und 50 μM Genistein präinkubiert und anschließend für 60 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Die Daten zeigen die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die Kontrolle (Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3 Experimente, * $p < 0,01$). (B) HUVEC wurden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert, fixiert und anschließend gefärbt. Aktin-filamente sind grün, tyrosinphosphorylierte Proteine rot dargestellt. Die bakterielle DNA wurde mit DAPI blau angefärbt. Der Maßstab entspricht 2 μm.

Der Inhibitor bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aufnahme der Streptokokken in die Zellen (Abbildung 4.8). Es wurde eine ca. 70%ige Inhibierung bei 50 μM

Genistein beobachtet ($p < 0,01$). Das Lösungsmittel DMSO allein hatte keinen Einfluss auf die Internalisierung (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass es zur Aktivierung von PTKs in unmittelbarer Nähe der Bakterien kommt, was mit einer zunehmenden Tyrosinphosphorylierung von Effektorproteinen der PTKs einhergehen sollte. Immunfluoreszenz-Analysen von HUVEC, die für 30 Minuten mit *S. pyogenes* infiziert wurden, zeigten eine massive Zunahme der Tyrosinphosphorylierung in der Umgebung der Streptokokken, die mit der Akkumulation von Aktin einhergingen (Abbildung 4.8). Zusätzlich konnte im Western Blot eine Zunahme von tyrosinphosphorylierten Proteinen im Verlauf der Infektion nachgewiesen werden, die in nichtinfizierten Kontrollzellen nicht zu beobachten war (nicht gezeigt).

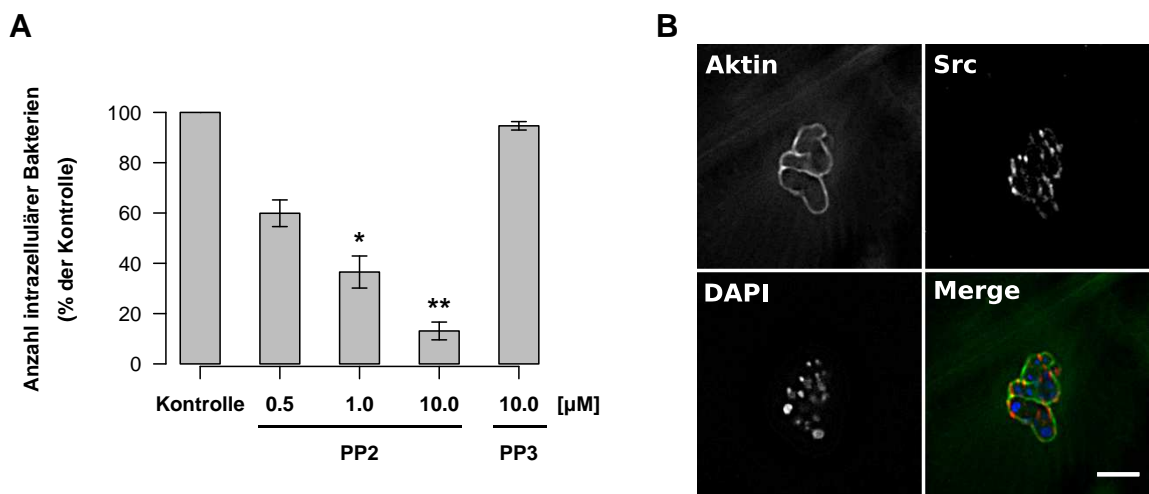


Abbildung 4.9: Effekt des Src-Kinase Inhibitors PP2 auf die Internalisierung von *S. pyogenes* A128 und Lokalisation mit Aktin und Src-Kinase. (A) HUVEC wurden für 15 Minuten mit 0.5, 1.0 und 10.0 μM PP2 bzw. mit 10.0 μM des nichtaktiven Homologs PP3 präinkubiert und anschließend für 60 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Die Daten zeigen die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die Kontrolle (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$ Experimente, $*p < 0,05$, $**p < 0,005$). **(B)** HUVEC wurden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert, fixiert und anschließend gefärbt. Aktinfilamente sind grün, die Src-Kinase rot dargestellt. Die bakterielle DNA wurde mit DAPI blau angefärbt. Der Maßstab entspricht 2 μm .

Es konnte gezeigt werden, dass nach Rezeptorstimulation durch pathogene Bakterien verschiedene PTKs aktiviert werden können. Eine Klasse von PTKs, die auch in HUVEC in *lipid rafts* lokalisiert ist, ist die Familie der Src-Kinase [168]. Um die Rolle der Src-Kinase bei der Internalisierung von *S. pyogenes* zu untersuchen, wurden Inhibitionsstudien mit dem spezifischen Src-Kinase-Inhibitor PP2 sowie seinem inaktiven Homolog PP3 durchgeführt. Die Zellen wurden 15 Minuten mit den Inhibitoren präinkubiert und anschließend für 60 Minuten infiziert. Danach erfolgte die Quantifizierung der intrazellulären Bakterien. Wie Abbildung 4.9 A zeigt, führte die Inkubation mit PP2 zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Aufnahme von *S. pyogenes*, die in einer 87%igen Inhibierung bei 10 μM

PP2 resultierte ($p < 0,005$). Das inaktive Homolog PP3 und DMSO (nicht gezeigt) interferierten hingegen nicht mit der Internalisierung. Des Weiteren konnte mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden, dass es zur Rekrutierung der Src-Kinase zu den zellassoziierten Bakterien kam. Auch in diesem Fall ging die Rekrutierung der Kinase mit der Akkumulation von Aktin in der Umgebung der Streptokokken einher (Abbildung 4.9 B). Diese Ergebnisse wiesen auf eine Beteiligung der Src Kinase bei der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 hin.

4.3.2 Die Src-Kinase wird während der Internalisierung aktiviert

Um zu überprüfen, ob die Src-Kinaseaktivität während der Infektion mit *S. pyogenes* A128 verändert ist, wurde der Aktivitätsstatus der Kinase mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Diese Antikörper ermöglichen eine Aussage über den Phosphorylierungszustand der regulatorischen Tyrosinreste der Kinase [23].

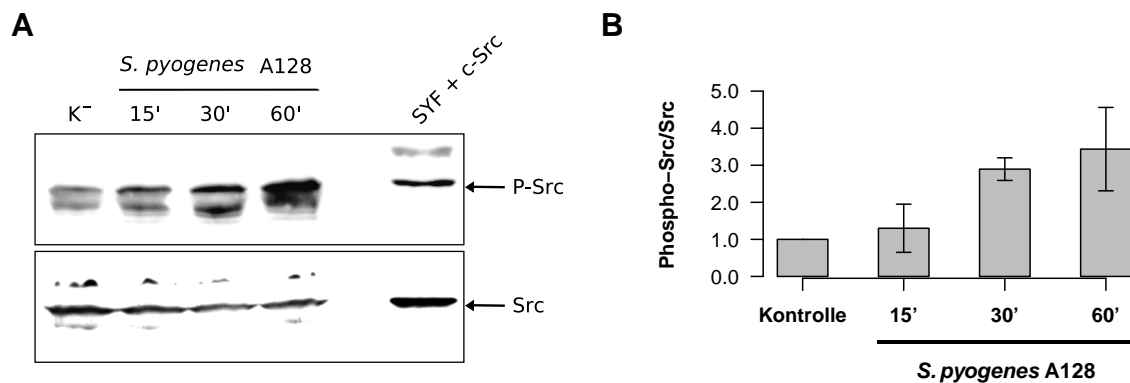


Abbildung 4.10: Phosphorylierung der Src-Kinase in *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC. (A) HUVEC wurden für 15, 30 und 60 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Als Kontrollen dienten nichtinfizierte Zellen (K⁻) sowie serumstimulierte SYF + c-Src-Zellen. Die Phosphorylierung der Src-Kinase wurden im Western Blot mit Anti-Phospho-Src Antikörpern nachgewiesen (P-Src). Die Gesamtmenge an Src im Lysat wurde mit einem Anti-Src Antikörper bestimmt (Src). (B) Densitometrische Analyse der Src-Phosphorylierung dargestellt als Verhältnis von Phospho-Src zu Gesamt-Src (Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 2 Experimente).

Zu diesem Zweck wurden die Zellen für fünf Stunden in Medium mit 0.1% FBS kultiviert, um die basalen Phosphorylierungsspiegel der Zellen zu senken. Anschließend wurden die Zellen mit *S. pyogenes* A128 für die in Abbildung 4.10 angegebenen Zeiten infiziert und danach lysiert. Die Proben wurden im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper, der phosphoryliertes Tyr⁴¹⁶ erkennt, analysiert. Dieser Tyrosinrest befindet sich im sog. *activation loop* der Src-Kinase und ist ein Indikator für die aktivierte Form der Src-Kinase [121]. Wie in Abbildung 4.10 A zu sehen ist, kam es im Verlauf der Infektion zu einer Zunahme von phosphoryliertem Tyr⁴¹⁶, verglichen mit den nichtinfizierten Kontrollzellen. Als Posi-

tivkontrolle dienten serumstimulierte SYF-Zellen, die c-Src re-exprimierten (siehe Kapitel 4.3.4). Die densitometrische Analyse von zwei unabhängigen Experimenten ergab eine maximale, 3,4fache Zunahme der aktiven Form der Kinase nach 60 Minuten (Abbildung 4.10 B).

4.3.3 Die Hemmung der Src-Kinase verhindert die Bildung der Membranausstülpungen und die Akkumulation von Aktin

Um zu untersuchen, ob die Zellen auch ohne aktive Src-Kinase noch zur Bildung der Membranprotrusionen und zur Akkumulation von Aktin in der Lage sind, wurden in der Gegenwart des Src-Kinase-Inhibitors PP2 infizierte Zellen elektronen- und lichtmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 10 μ M PP2 bzw. mit DMSO präinkubiert und anschließend in der Gegenwart von PP2 bzw. DMSO für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert.

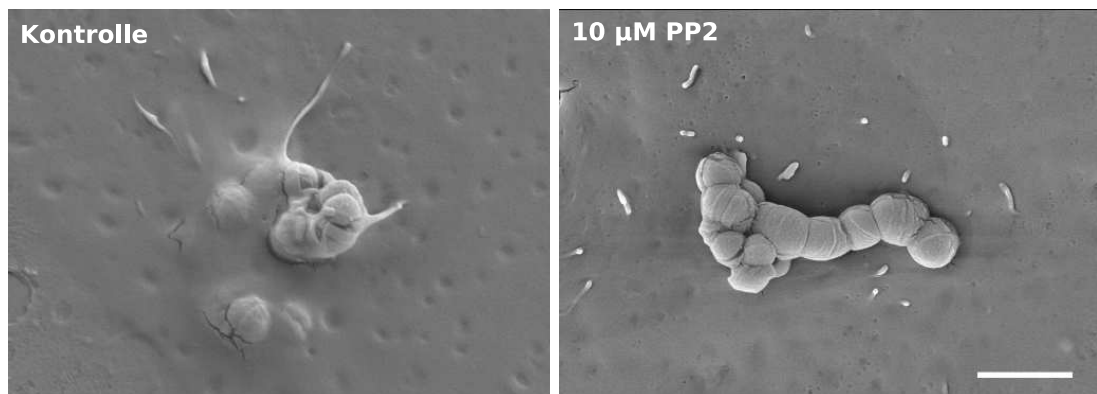


Abbildung 4.11: Effekt des Src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die Bildung von Membranprotrusionen während der Aufnahme von *S. pyogenes* A128. HUVEC wurden für 15 Minuten mit 10 μ M PP2 präinkubiert und anschließend mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Nach 30 Minuten wurden die Proben für die elektronenmikroskopische Analyse fixiert. Nach der Präparation wurden die infizierten Zellen mittels FESEM analysiert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen des Internalisierungsprozesses in unbehandelten Zellen (Kontrolle) und in inhibitorbehandelten Zellen (10 μ M PP2). Der Balken entspricht 2 μ m.

Wie Abbildung 4.11 zeigt, war die Bildung der Membranausstülpungen, die die Bakterien umschließen, in der Gegenwart des Inhibitors nicht mehr zu beobachten. Lediglich die Bildung kurzer Filopodien-ähnlicher Fortsätze war in der Umgebung der Streptokokken sichtbar. Abbildung 4.12 zeigt darüber hinaus, dass die Polymerisierung von Aktin in der Umgebung der Bakterien in den mit PP2 behandelten Zellen nicht mehr stattfand. In unbehandelten Kontrollzellen kam es hingegen zur typischen Akkumulation von Aktin in der Umgebung der Bakterien. Bei Auftragung der Fluoreszenzintensitäten über die Distanz,

auf der in Abbildung 4.12 a' markierten Linie war eine deutliche Zunahme der Intensität des grünen Kanals (Aktin) in der Umgebung der Streptokokken (rote Linie) zu erkennen. In den mit PP2 behandelten Zellen blieb die Intensität des grünen Kanals entlang der in Abbildung 4.12 b' dargestellten Linie hingegen unverändert, was gleichbedeutend mit einer nicht stattfindenden Akkumulation von Aktin ist.

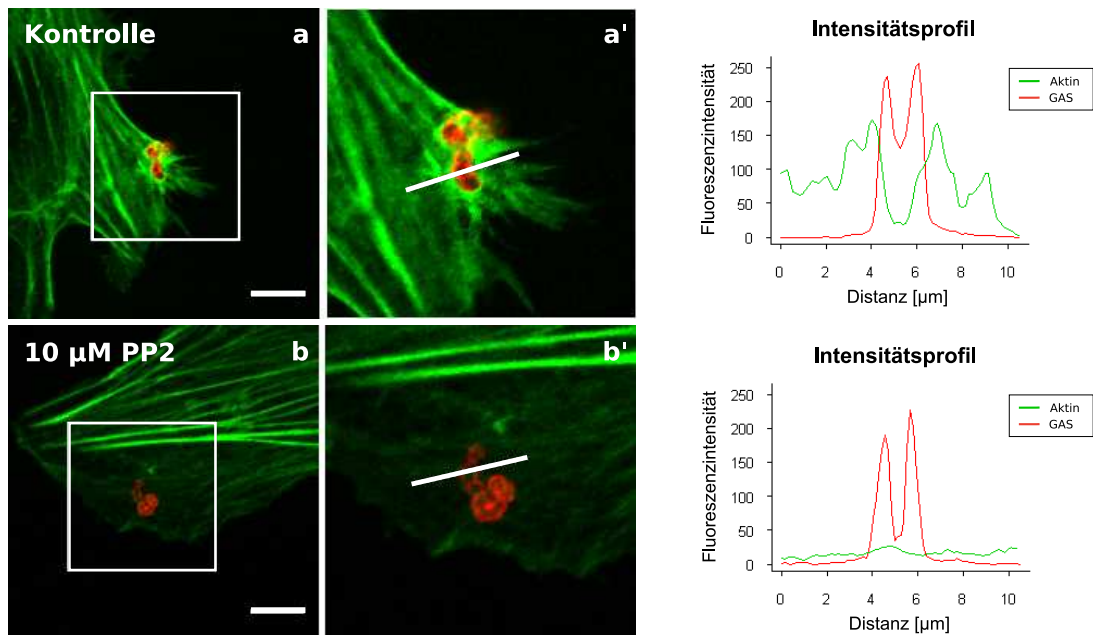


Abbildung 4.12: Effekt des Src-Kinase-Inhibitors PP2 auf die Akkumulation von Aktin in der Umgebung von *S. pyogenes* A128. HUVEC wurden für 15 Minuten mit 10 µM PP2 präinkubiert und anschließend mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Nach 30 Minuten wurden die Proben fixiert. Die Streptokokken sind rot dargestellt und das zelluläre F-Aktin wurde mit Alexa 488-konjugiertem Phalloidin (grün) gefärbt. Die Proben wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. a' und b' sind Vergrößerungen der eingerahmten Bereiche in a und b. Die lokale Rekrutierung von Aktin (grüne Linie) zu den zellassoziierten Bakterien (rote Linie) wurde durch Auftragen der Fluoreszenzintensitätsprofile des roten bzw. grünen Kanals gegen die Distanz entlang der weißen Linie in a' bzw. b' quantifiziert. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Diese Daten zeigten, dass die Polymerisation von Aktin, die mit der Bildung der protrusiven Membranstrukturen einhergeht, von der Aktivität der Src-Kinasen abhängig ist.

4.3.4 Src-Kinase-defiziente Zellen sind resistent gegen GAS A128

Die Verlängerung von Aktinfilamenten stellt die treibende Kraft für die Bildung von Membranausstülpungen dar. Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass es zur Aktivierung der Src-Kinase während der Aufnahme der Streptokokken in HUVEC kommt.

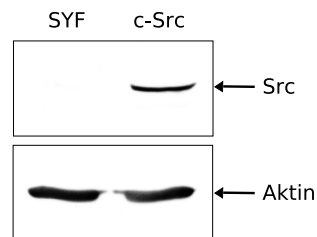


Abbildung 4.13: Expression von c-Src in SYF-Fibroblasten. Die Expression von c-Src in SYF-Zellen (SYF) und in c-Src re-exprimierenden SYF-Zellen (c-Src) wurde in Zelllysaten mittels Western Blot nachgewiesen. Das Vorhandensein gleicher Proteinmengen wurde durch einen Anti-Aktin Western Blot verifiziert.

Um die Beteiligung der Src-Kinase im Internalisierungsprozess weiter zu bestätigen, wurden Fibroblasten von Src, Yes und Fyn-defizienten Mausembryos (SYF Zellen) verwendet [78]. Diese Zellen sollten resistent gegen *S. pyogenes* A128 sein, da ihnen alle drei Mitglieder der Src-Kinasefamilie, die normalerweise in diesem Zelltyp exprimiert werden, fehlen. Als Kontrolle wurden c-Src exprimierende SYF Zellen (SYF + c-Src) benutzt. Die Expression von c-Src wurde durch Western Blot von Gesamtzellextrakten mit einem polyklonalen Anti-Src Antikörper in Abbildung 4.13 dargestellt.

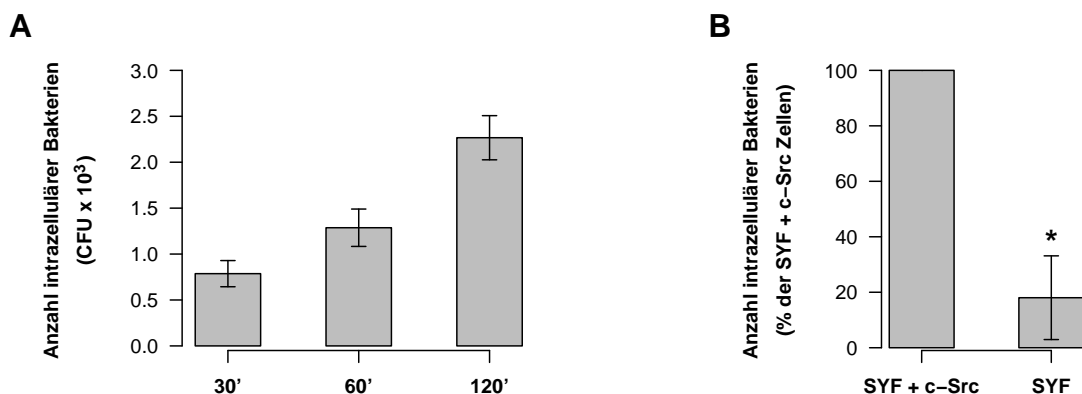


Abbildung 4.14: Quantifizierung der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in Src-defiziente Zellen. (A) Die Internalisierung der Streptokokken in SYF + c-Src Zellen wurde nach 30, 60 und 120 Minuten mittels Gentamycin-Assay bestimmt. Die Grafik zeigt die Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment (Dreifachansatz). (B) SYF und SYF + c-Src Zellen wurden für 120 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert und die Anzahl intrazellulärer Bakterien mittels Gentamycin-Assay bestimmt. Die Daten zeigen die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die SYF + c-Src Zellen (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 3$ Experimente (Dreifachansätze)). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ist mit einem Stern markiert (* $p < 0,05$).

Um zu überprüfen, ob *S. pyogenes* A128 in der Lage ist, die SYF + c-Src Zellen zu invadieren, wurden diese für 30, 60 und 120 Minuten infiziert, mit Medium gewaschen und eine weitere Stunde in der Gegenwart von Gentamycin/Penicillin inkubiert („Gentamycin-Protektionsassay“). Dadurch wurden alle extrazellulären Bakterien abgetötet. Die intrazellulären Bakterien wurden anschließend ausplattiert und quantifiziert.

Wie in Abbildung 4.14 A zu sehen ist, kam es mit zunehmender Infektionsdauer zu einer Akkumulation der Streptokokken in die SYF + c-Src Zellen. *S. pyogenes* A128 war hingegen nicht in der Lage, die SYF Zellen zu invadieren. Die Anzahl intrazellulärer Streptokokken war in diesen Zellen um 82% reduziert (Abbildung 4.14 B).

Die differentielle Fluoreszenzfärbung von extra- und intrazellulären Bakterien bestätigte zudem, dass nach zwei Stunden Infektion intrazelluläre Bakterien in den SYF + c-Src Zellen zu finden waren. In den SYF Zellen waren zwar ähnliche Mengen an zellassoziierten Streptokokken zu finden, diese befanden sich aber zum überwiegenden Teil extrazellulär lokalisiert (Abbildung 4.15).

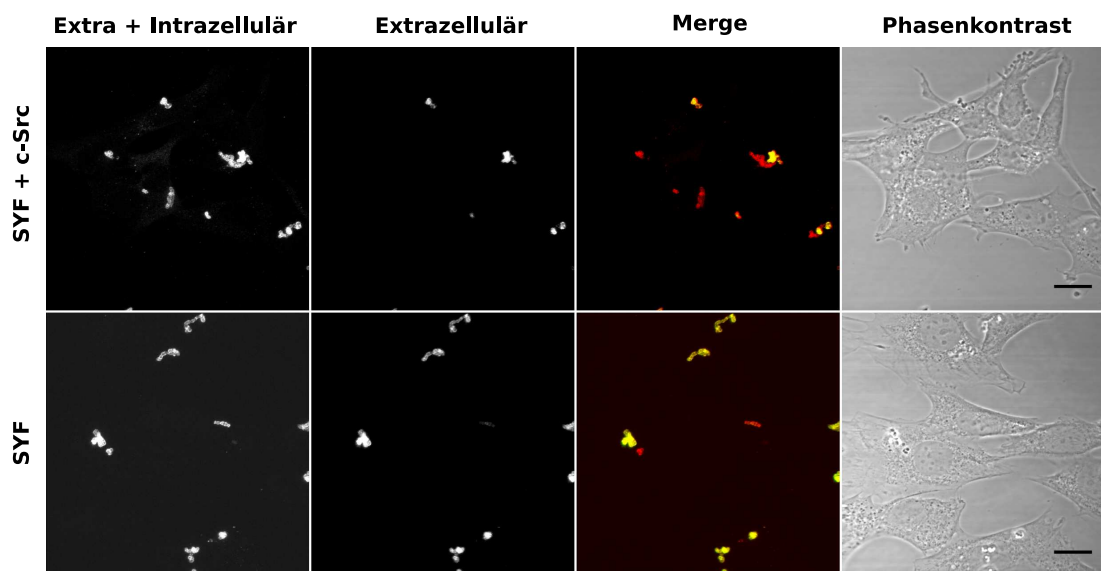


Abbildung 4.15: Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in SYF und SYF + c-Src Zellen. SYF und SYF + c-Src Zellen wurden für zwei Stunden mit *S. pyogenes* A128 infiziert und danach fixiert. Intra- und extrazelluläre Streptokokken wurden mit einem polyklonalen Antikörper und entsprechenden sekundären Antikörpern differentiell angefärbt. Extrazelluläre Streptokokken sind in gelb dargestellt, die intrazellulären Streptokokken in rot. Um die Zelloassoziation der extrazellulären Streptokokken, insbesondere bei den SYF Zellen zu zeigen, ist ebenfalls das entsprechende Phasenkontrastbild dargestellt. Der Maßstab entspricht 20 µm.

Diese Ergebnisse unterstreichen die wichtige Rolle, die die Src-Kinase bei der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 in eukaryontischen Zellen spielt.

4.4 Die Aktivierung von Rac1 ist essentiell für die Internalisierung von *S. pyogenes* A128

Die kleinen GTP-bindenden Proteine Rac, Cdc42 und RhoA fungieren, wie auch die anderen Mitglieder der Rho-Familie, in den Wirtszellen als molekulare Schalter für zelluläre Prozesse wie bspw. der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts bei Bewegungsvorgängen und während der Phagozytose von pathogenen Bakterien [120, 135, 62]. Insbesondere Rac1 wurde mit der Bildung von Membranausstülpungen in Verbindung gebracht [136].

4.4.1 Rac1 wird zur Internalisierungsstelle rekrutiert

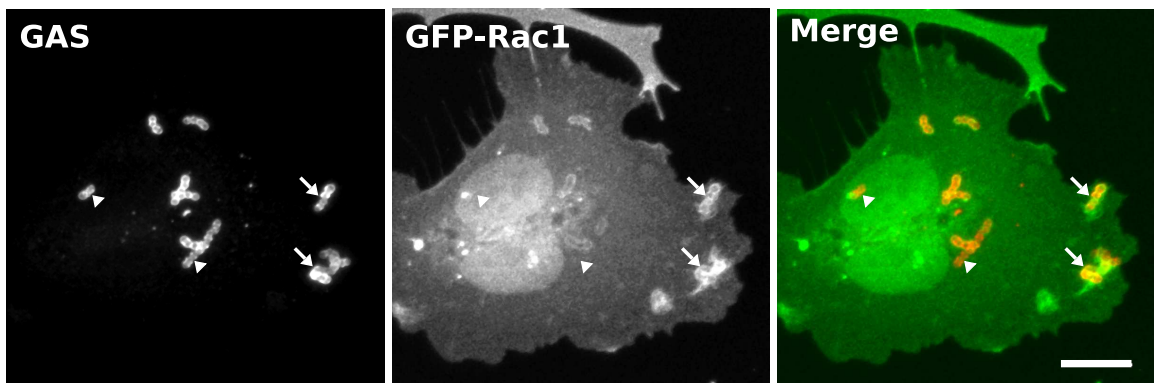


Abbildung 4.16: Lokalisation von *S. pyogenes* A128 und GFP-Rac1. HUVEC wurden mit GFP-Rac1 transfiziert, 16 Stunden nach der Transfektion für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert und danach fixiert. Die Streptokokken (GAS) wurden mit einem polyklonalen Antikörper angefärbt und sind rot dargestellt. Das GFP-markierte Rac1 ist in grün dargestellt. Die Pfeile markieren die lokale Akkumulation von Rac1 in der unmittelbaren Nähe der Streptokokken. Die Pfeilspitzen zeigen Streptokokken, die keine Kolokalisation aufweisen. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Um den Einfluss von Rac1 auf die Aufnahme der Streptokokken zu untersuchen, wurden HUVEC transient mit einer grün fluoreszierenden Variante von Rac1 (GFP-Rac1) transfiziert. Durch Verwendung der Nukleofektionstechnik konnte eine Transfektionseffizienz von ca. 80% erreicht werden (Daten nicht gezeigt). 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit *S. pyogenes* A128 für 30 Minuten infiziert und die Rekrutierung von GFP-Rac1 mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Streptokokken wurden zu diesem Zweck mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Alexa 568-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, kam es zu einer Akkumulation von Rac1 um die Streptokokken (Pfeile). Bakterien, die keine Kolokalisation aufwiesen, sind mit Pfeilspitzen markiert. Die Tatsache, dass nicht alle zellassoziierten Bakterien mit Rac1 kolokalisierten, deutet auf eine Beteiligung der GTPase nur während bestimmter Phasen der Aufnahme hin.

4.4.2 Funktionales Rac1 ist für die Internalisierung essentiell

Da die Lokalisationsstudien auf eine Beteiligung von Rac1 während der Internalisierung der M3 Streptokokken hindeuteten, wurde als nächstes untersucht, ob eine Aktivierung von Rac1 für die Aufnahme essentiell ist.

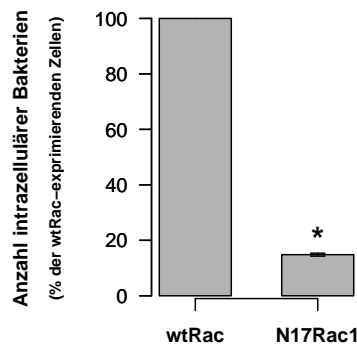


Abbildung 4.17: Quantifizierung der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in wtRac1- und N17Rac1-exprimierende Zellen. HUVEC wurden mit wtRac1 bzw. N17Rac1 transfiziert und mit *S. pyogenes* A128 für eine Stunde infiziert. Die Daten zeigen die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die wtRac1-exprimierenden Zellen (Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$ Experimente). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten ist mit einem Stern markiert (* $p < 0,001$).

Zu diesem Zweck wurden die Zellen transient mit einem Wildtyp-Rac1-Konstrukt (GFP-wtRac1) und der dominant-negativen Form von Rac1 (GFP-N17Rac1) transfiziert. Beide Konstrukte waren mit GFP fusioniert, was die Identifizierung der transfizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie erlaubte. Die Zellen wurden 16 Stunden nach der Transfektion mit *S. pyogenes* A128 für eine Stunde infiziert. Anschließend wurden die intra- und extrazellulären Bakterien differentiell angefärbt und ihre Anzahl quantifiziert.

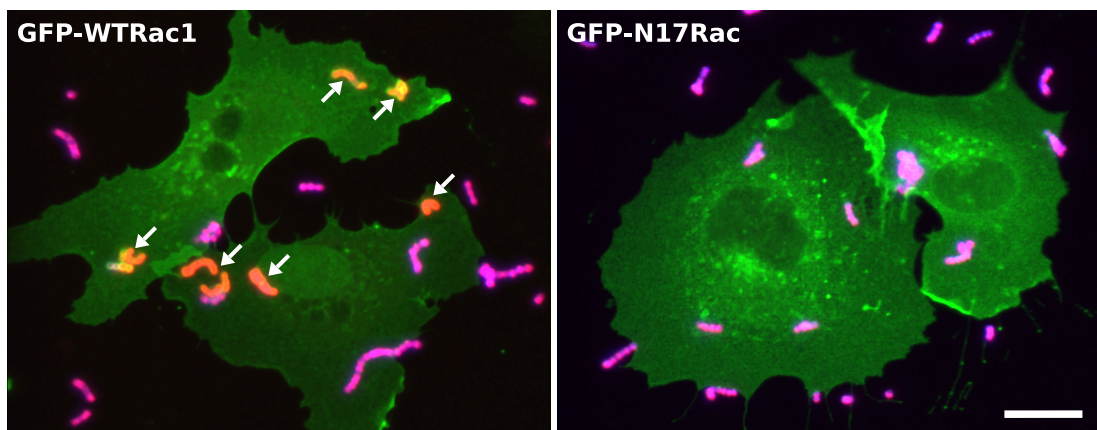


Abbildung 4.18: Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in wtRac1- und N17Rac1-exprimierende Zellen. HUVEC wurden mit GFP-wtRac1 bzw. GFP-N17Rac1 transfiziert und nach 16 Stunden mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Nach einer Stunde wurden die Proben fixiert und die Streptokokken wurden differentiell mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern angefärbt. Intrazelluläre Streptokokken erscheinen rötlich bis gelb (Pfeile), während extrazelluläre Bakterien magentafarben dargestellt sind. Der Maßstab entspricht 20 μm .

Wie Abbildung 4.17 zeigt, führte die Expression von GFP-markiertem, dominant-negativen Rac1 (N17Rac1) zu einer signifikanten Hemmung der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 ($p < 0,001$). Die Tatsache, dass trotzdem noch ca. 15% intrazelluläre Bakterien zu finden waren, lässt sich vermutlich auf eine unvollständige Hemmung des endogenen Rac1 zurückführen [50].

Wie in Abbildung 4.18 zu erkennen ist, waren die Streptokokken noch in der Lage, an die mit der dominant-negativen Form von Rac1 transfizierten Zellen zu binden. Eine Internalisierung fand aber kaum noch statt. Die extrazellulären Bakterien sind magentafarben dargestellt, während die intrazellulären Bakterien rötlich bis gelb erscheinen (Pfeile).

4.4.3 Rac1 wird während der Internalisierung aktiviert

Um die Aktivierung von Rac1 während der Internalisierung der Streptokokken direkt zu überprüfen, wurden Präzipitationsexperimente durchgeführt. Da nur die aktive, d. h. GTP-gebundene Form von Rac1 nach einer Konformationsänderung in der Lage ist, an Effektorproteine zu binden, ist es möglich, mit Hilfe von der an Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierten *Cdc42-Rac1 interactive binding domain* (CRIB) von PAK1 die Aktivierung von Rac1 zu bestimmen [141]. Dies erfolgte durch Präzipitation des Rac/GST-CRIB-Komplexes nach Bindung an Glutathion-Sephadex und dem anschließenden Nachweis von Rac1 im Western Blot (Abbildung 4.19 A).

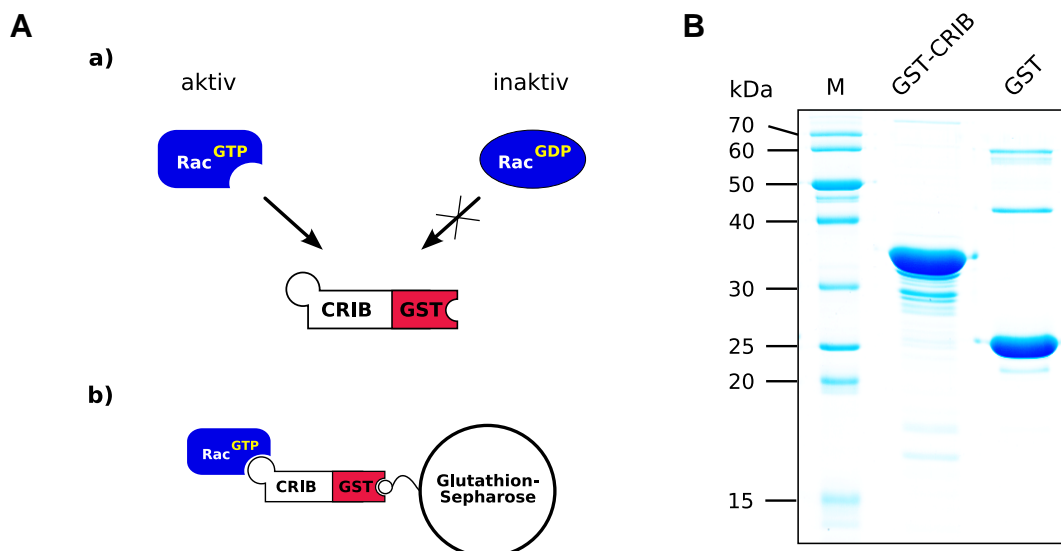


Abbildung 4.19: Bestimmung der Rac1-Aktivität durch Präzipitation mit GST-CRIB. (A) Nur die aktivierte, GTP-gebundene Form von Rac1 ist in der Lage, an die mit GST fusionierte CRIB-Domäne von PAK1 zu binden (a). Durch Inkubation mit Glutathion-Sephadex kann der Rac1/GST-CRIB-Komplex präzipitiert werden (b, Größenverhältnis nicht maßstabsgetreu). (B) Überexpression und Aufreinigung von GST und der mit GST fusionierten CRIB-Bindungsdomäne von PAK1 (GST-CRIB) für die Präzipitation von GTP-Rac1 (M: Molekulargewichtsmarker).

Zu diesem Zweck wurden GST und GST-CRIB in *E. coli* überexprimiert, an Glutathion-Sepharose gekoppelt und aufgereinigt. Um die Bindungsfähigkeit von CRIB nicht zu beeinträchtigen erfolgte die Aufreinigung immer direkt vor dem Präzipitations-Experiment. Ein typische Aufreinigung ist in Abbildung 4.19 B dargestellt.

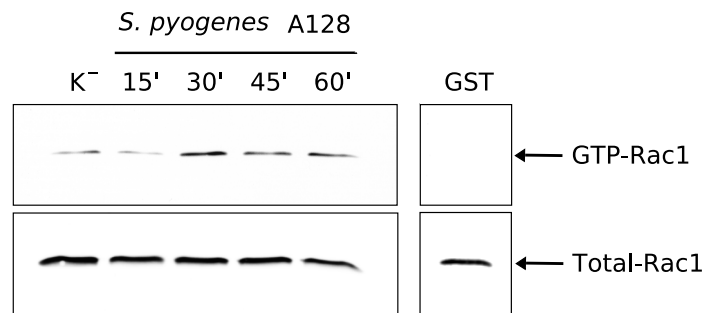


Abbildung 4.20: Aktivierung von Rac1 durch *S. pyogenes* A128 in HUVEC. HUVEC wurden für 15, 30, 45 und 60 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert und anschließend wurde die Rac1-Aktivität in den Zelllysaten durch Präzipitation mit GST-CRIB bzw. mit GST bestimmt. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte Zellen (K^-). GTP-Rac1 und Total-Rac1 wurden im Western Blot mit spezifischen Anti-Rac1 Antikörpern nachgewiesen.

HUVEC-Monolayer wurden für zwei Stunden in Medium mit 0.1% FBS kultiviert um die basalen Spiegel an aktivem Rac1 zu reduzieren. Danach wurden die Zellen mit *S. pyogenes* A128 in Medium ohne Serum für die in Abbildung 4.20 angegebenen Zeiten nach dem in Kapitel 4.1.3 beschriebenen Protokoll infiziert und anschließend lysiert. Aktives Rac1 wurde mit GST-CRIB präzipitiert und anschließend im Western Blot mit einem Rac1-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Um die Spezifität der Bindung von Rac1 an GST-CRIB zu zeigen, wurde eine Präzipitation von Rac1 mit GST aus serumstimulierten HUVEC durchgeführt. Wie Abbildung 4.20 zeigt, ist keine Bindung von GTP-Rac1 an GST zu beobachten. Über den zeitlichen Verlauf der Infektion kam es ausschließlich in den mit *S. pyogenes* A128-infizierten Zellen zu einer Aktivierung von Rac1, verglichen mit nicht-infizierten Kontrollzellen. Das aktive Rac1 repräsentierte jedoch nur einen kleinen Teil der gesamten Menge an Rac1 in den infizierten Zellen. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Aktivierung nur in der unmittelbaren Nähe der Streptokokken, d. h. in einem lokal eng begrenzten Bereich erfolgt.

Tabelle 4.2 zeigt die densitometrische Analyse der Rac1-Aktivierung von drei unabhängigen Experimenten. Die Infektion mit *S. pyogenes* führte zu einer signifikanten Aktivierung zwischen 30 und 45 Minuten, was mit der maximalen Akkumulation von Aktin in diesem Zeitraum einhergeht (vgl. Tabelle 4.1).

Kontrolle	<i>S. pyogenes</i> A128			
	15 min	30 min	45 min	60 min
1.00 ± 0.00	1.36 ± 0.34	1.91 ± 0.52	1.90 ± 0.19	1.82 ± 0.18

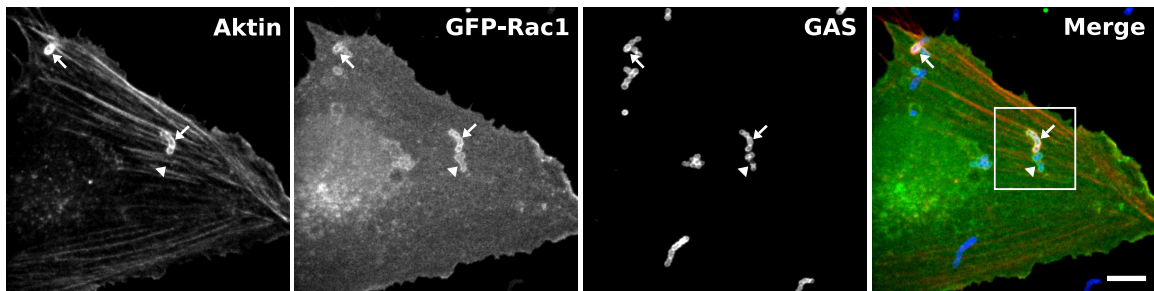
Tabelle 4.2: Densitometrische Analyse der Rac1-Aktivierung. Dargestellt ist die Zunahme an aktivem Rac1, als Verhältnis von GTP-Rac1 zu Total-Rac1, in *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC bezogen auf die nichtinfizierte Kontrolle (Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 3 Experimente).

4.4.4 GAS A128 kolokalisiert mit Aktin und GFP-Rac1

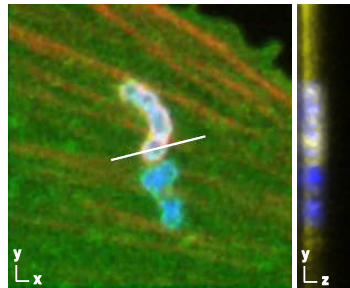
Da aktives Rac1 offensichtlich für die Internalisierung von M3 Streptokokken in HUVEC essentiell ist und die Bildung von protrusiven Membranausstülpungen in der Regel mit der Akkumulation von Aktin einhergeht, sollte es zu einer Kolokalisation von Rac1 und Aktin in der unmittelbaren Umgebung der Streptokokken kommen. Um diese Frage zu untersuchen, wurden HUVEC mit GFP-Rac1 transfiziert und nach 16 Stunden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Die Bakterien wurden mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Cy5-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Zusätzlich zu den Bakterien wurde das F-Aktin in den Zellen mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin gefärbt und die Proben mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

Tatsächlich kam es während bestimmter Zeitpunkte des Internalisierungsprozesses zu einer Akkumulation von Aktin und GFP-Rac1 um die Bakterien (Pfeile in Abbildung 4.21 A). In Abbildung 4.21 B ist dies noch einmal vergrößert dargestellt. Darüber hinaus zeigt das Diagramm der Fluoreszenzintensitäten deutlich eine Überlagerung der maximalen Intensitäten des roten (Aktin) und grünen (Rac1) Kanals. Die maximalen Intensitäten des blauen Kanals (GAS) - aus Übersichtlichkeitsgründen als schwarze Linien/blauer Kreis dargestellt - befinden sich innerhalb der Maxima von Aktin und Rac1, was auf eine Akkumulation von Rac und Aktin um die Streptokokken hindeutet. Diese Kolokalisation scheint jedoch nur transient zu sein, was bei einem dynamischen Prozess, wie der Bildung von Membranausstülpungen auch zu erwarten ist. Es waren auch Streptokokken vorhanden, die nur eine Akkumulation mit GFP-Rac1 aufweisen (Pfeilspitze in Abbildung 4.21 A). Diese Bakterien befanden sich schon in den Zellen (blau-grünes Erscheinungsbild und z-Ansicht in Abbildung 4.21 B) und wiesen eine geringere Menge an akkumuliertem Rac1 auf, was mit einem Ende des Internalisierungsprozesses und dem damit einhergehenden Abbau der Aktinfilamente erklärt werden kann.

A



B



C

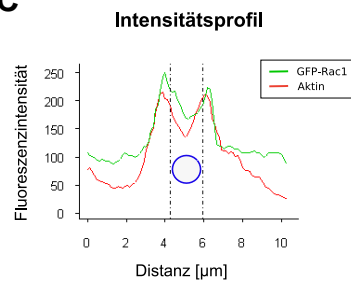


Abbildung 4.21: Lokalisation von *S. pyogenes* A128 mit GFP-Rac1 und Aktin. HUVEC wurden mit GFP-Rac1 transfiziert und nach 16 Stunden mit *S. pyogenes* A128 infiziert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen fixiert, gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. **(A)** Die Pfeile markieren die lokale Rekrutierung von GFP-Rac1 und Aktin in der unmittelbaren Nähe der Streptokokken. Die Pfeilspitzen zeigen Streptokokken, die nur eine Kolo-kalisation mit GFP-Rac1 aufweisen. Der Maßstab entspricht 15 µm. **(B)** Vergrößerung des markierten Bereichs aus A mit Projektion der z-Ansicht. **(C)** Die lokale Rekrutierung von Aktin (rote Linie) mit GFP-Rac1 (grüne Linie) wurde durch Auftragung der Fluoreszenzintensitäts-Profile des roten bzw. grünen Kanals entlang der weißen Linie in B gegen die Distanz quantifiziert. Die senkrechten Linien bzw. der blaue Kreis markieren die maximalen Intensitäten des blauen Kanals.

4.4.5 Die Aktinpolymerisation wird durch Arp2/3 initiiert

Die Aktinpolymerisation in protrusiven Strukturen wird auf molekularer Ebene von verschiedenen Proteinen kontrolliert. Einer der Hauptpolymerisationsfaktoren ist der Arp2/3-Komplex, der auch von Rac1 aktiviert wird. Die Aktivierung erfolgt dabei nicht direkt, sondern über Proteine der WASP-Familie. Falls der Internalisierungsprozess mit der Aktinakkumulation nach diesem prinzipiellen Schema abläuft, müsste es also auch zu einer Akkumulation des Arp2/3-Komplexes während der Bildung der aktinreichen Protrusionen in der Nähe der Bakterien kommen, vorausgesetzt es handelt sich dabei um einen Rac1-abhängigen Prozess.

Um dies zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen von infizierten HUVEC durchgeführt. Die Streptokokken wurden mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. Der Arp2/3-Komplex, der sich aus sieben Untereinheiten zusammensetzt, wurde mit einem monoklonalen Antikör-

per gegen die p16-Untereinheit und Alexa 568-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Streptokokken sind in grün, der Arp2/3-Komplex in rot dargestellt.

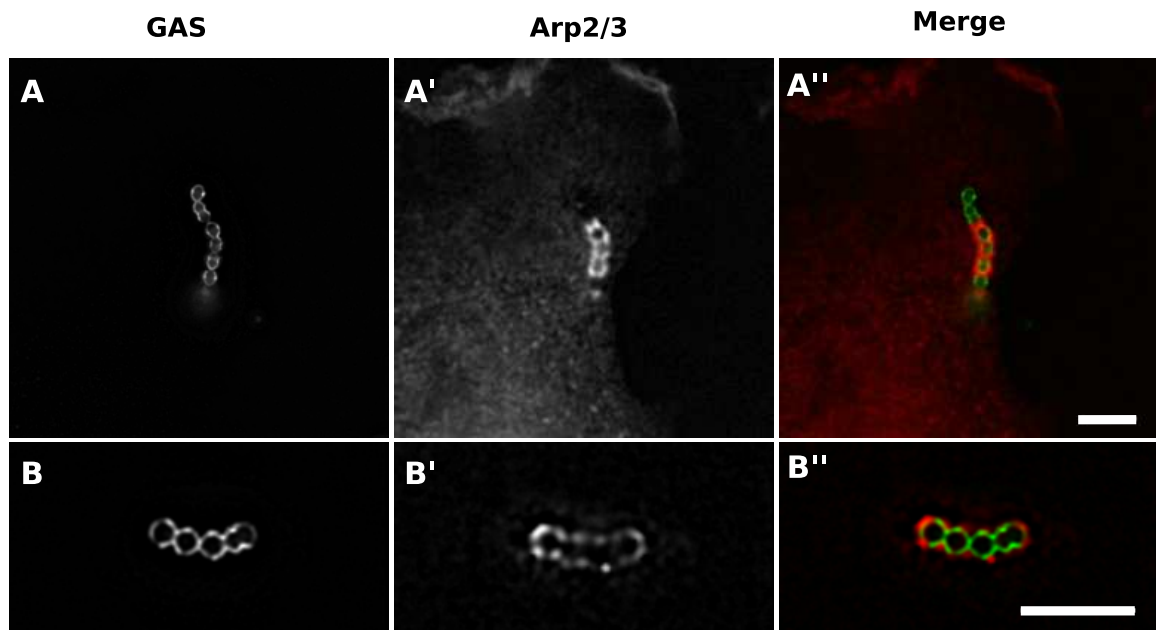


Abbildung 4.22: Lokalisation von *S. pyogenes* A128 mit dem Arp2/3-Komplex. HUVEC wurden für 30 Minuten mit *S. pyogenes* A128 (GAS) infiziert und anschließend fixiert. Die Streptokokken wurden mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt (A, B). Der Arp2/3 Komplex wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen die p16-Untereinheit und Alexa 568-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt (A', B'). A'' und B'' stellen jeweils Überlagerungen der beiden einzelnen Kanäle dar (Merge). Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Abbildung 4.22 zeigt eine starke Akkumulation der p16-Untereinheit des Arp2/3-Komplexes (A', B') in der Nähe der Bakterien (A, B). Im unteren Teil der Abbildung (B, B', B'') ist eine Vergrößerung eines solchen Ereignisses dargestellt. In Experimenten mit Dreifachmarkierungen (Aktin, Arp2/3-Komplex, GAS) konnte eine Kolo-kalisation dieser drei Komponenten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Damit konnte gezeigt werden, dass es bei der Internalisierung von *S. pyogenes* A128, zu einer Aktivierung von Rac1 kommt, die mit der Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes einhergeht. Diese Rekrutierung führt zur Bildung von Aktinfilamenten in der unmittelbaren Umgebung der Streptokokken, die die treibende Kraft für die Bildung der beobachteten Membranprotrusionen sind.

4.5 Die Funktion von PI3-Kinasen bei der Internalisierung von *S. pyogenes* A128

Eine weitere wichtige Klasse von Kinasen, die in der Lage sind zytoskelettale Prozesse zu beeinflussen, stellen die PI3-Kinasen dar [178, 112]. Im Fall der gut charakterisierten Internalisierung von SfbI-exprimierenden Streptokokken in Epithelzellen konnte eine Abhängigkeit von der Aktivität der PI3Ks nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse konnten später mit einem *S. gordonii*-Stamm, der einen Teil des SfbI-Proteins heterolog auf der Oberfläche exprimierte, auch für die Internalisierung in HUVEC gezeigt werden. Ein GAS-Stamm des Serotyps M3 zeigte im Vergleich dazu keine Veränderung des Invasionsverhaltens (M. Rohde und S. Talay, unveröffentlicht; N. Petermann, Diplomarbeit 2003).

4.5.1 Die Internalisierung benötigt keine aktiven PI3Ks

In Kapitel 4.4 wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Rac1 und die damit einhergehende Akkumulation von Aktin essentiell für die Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 sind. Um eine mögliche Beteiligung von PI3Ks mit Blick auf die Aktivierung von Rac1 und die Akkumulation von Aktin, zu untersuchen, wurde als erstes die Internalisierung der *S. pyogenes*-Stämme A40 (SfbI-positiv) und A128 in der Gegenwart des PI3K-Inhibitors LY294002 bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 25 µM LY294002 präinkubiert und anschließend in der Gegenwart des Inhibitors infiziert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien wurde nach der differentiellen Färbung extra- und intrazellulärer Streptokokken quantifiziert.

Im Fall von *S. pyogenes* A40 kam es zu einer 60%igen Reduktion der intrazellulären Bakterien in Zellen, die mit dem Inhibitor behandelt wurden. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien im Fall von *S. pyogenes* A128 wies hingegen keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 4.23 A).

Um auszuschließen, dass es bei Infektionen mit *S. pyogenes* A128 zu einer Inaktivierung des PI3K-Inhibitors kam, wurden Zellmonolayer mit 25 µM LY294002 präinkubiert und anschließend mit *S. pyogenes* A128 in der Gegenwart des Inhibitors und 2% FBS infiziert. Als Kontrollen dienten auch hier Zellen, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Nach drei Stunden wurden die Zellen lysiert und im Western Blot mit einem Antikörper, der die phosphorylierte Form der Proteinkinase Akt erkennt, analysiert. Akt ist ein Effektorprotein von Klasse I PI3Ks, dessen Phosphorylierung ein Maß für die Aktivierung dieser PI3K-Klasse ist. Zur Verifizierung der Proteinmengen wurde der Blot danach mit einem Antikörper, der die nicht-phosphorylierte Form von Akt erkennt, analysiert.

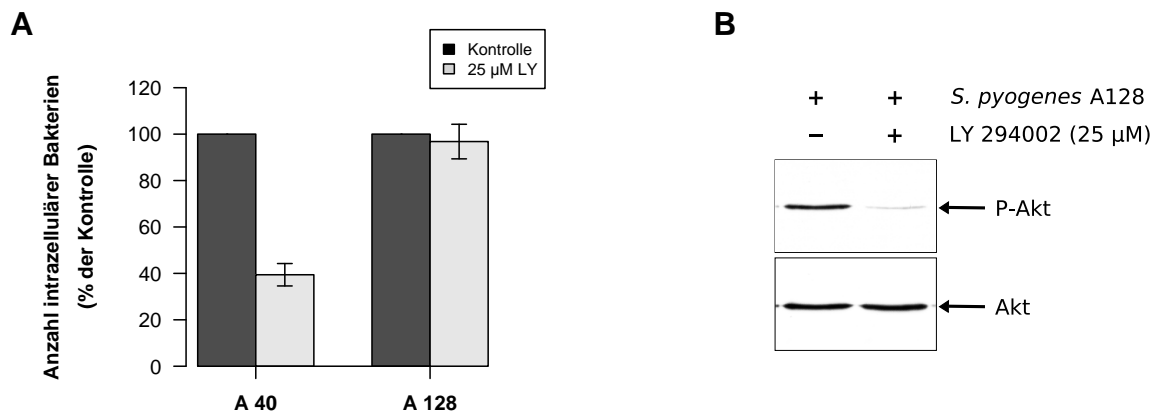


Abbildung 4.23: Effekt des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 auf die Internalisierung von *S. pyogenes* A40 und A128 und die Phosphorylierung von Akt in A128-infizierten HUVEC. (A) HUVEC wurden mit *S. pyogenes* A40 oder A128 ohne Inhibitor bzw. in der Gegenwart von 25 µM LY294002 (LY) für 60 Minuten infiziert. Die Daten zeigen die prozentuale Anzahl intrazellulärer Bakterien bezogen auf die Kontrolle (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$ Experimente). **(B)** Analyse der PI3-Kinase-abhängigen Phosphorylierung von Akt nach drei Stunden Infektion mit *S. pyogenes* A128 mittels Western Blot.

Wie die Ergebnisse des Western Blots zeigten, liegt im Fall der Infektion mit *S. pyogenes* A128 ohne Inhibitor ein Teil der Proteinkinase Akt in der phosphorylierten Form vor, was auf die Aktivierung von Klasse I PI3Ks zurückzuführen ist. Wurden die PI3Ks durch LY294002 gehemmt, war die phosphorylierte Form der Kinase hingegen fast nicht mehr nachweisbar, d. h. der Inhibitor war auch in der Gegenwart von GAS A128 aktiv (Abbildung 4.23 B). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Internalisierung in diesem Fall auf einem PI3-Kinase unabhängigen Weg erfolgte. Inwieweit die Phosphorylierung von Akt auf die durch die Bakterien ausgelösten Prozesse zurückzuführen ist, lässt sich anhand dieses Experiments nicht sagen, da die Aktivierung auch auf das im Assay anwesende Serum zurückzuführen sein könnte.

4.5.2 Rac1 wird auch in der Gegenwart des PI3K-Inhibitors aktiviert

Die Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 deutet auf einen PI3K-unabhängigen Mechanismus hin. Die Aktivierung von Rac1 ist hingegen in der Mehrzahl der untersuchten Fälle von PI3Ks abhängig [177]. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob es noch zur Aktivierung von Rac1 und der damit einhergehenden Akkumulation von Aktin in der Gegenwart des PI3K-Inhibitors kommt oder ob die Aufnahme in diesem Fall unabhängig von diesen Ereignissen, d. h. auf einem mechanistisch anderem Weg erfolgt.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen wieder mit 25 µM LY294002 präinkubiert und anschließend mit GAS A128 für 45 Minuten infiziert. Als Kontrolle für einen PI3K-ab-

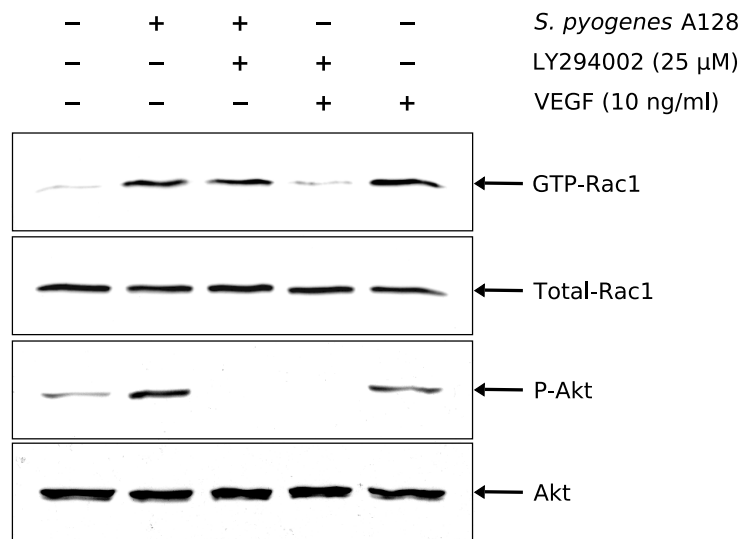


Abbildung 4.24: Aktivierung von PI3K und Rac1 in *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC in der Gegenwart von LY294002. HUVEC wurden mit *S. pyogenes* A128 infiziert bzw. mit VEGF stimuliert. Die Hemmung von PI3Ks erfolgte durch Inkubation mit 25 μ M LY294002. Aktives Rac1 und Phospho-Akt wurden anschließend im Western Blot nachgewiesen.

hängigen Weg der Rac1-Aktivierung dienten Zellen, die für zehn Minuten mit VEGF stimuliert wurden [186]. Die Zellen wurden nach der Infektion/Stimulation lysiert und aktives Rac1 wurde durch Präzipitation mit GST-CRIB und anschließendem Western Blot nachgewiesen. Die Aktivierung der PI3-Kinase wurde wiederum durch Western Blot mit einem phosphospezifischen Akt-Antikörper analysiert. Zusätzlich wurde das filamentöse Aktin der infizierten Zellen mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin gefärbt und die Zellen auf Akkumulation von Aktin um die Bakterien mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

Abbildung 4.24 zeigt, dass es sowohl bei der Infektion mit *S. pyogenes* A128 als auch bei der Stimulation mit VEGF - verglichen mit unstimulierten Zellen - zu einer Aktivierung von Rac1 (GTP-Rac1) kam. Diese Aktivierung ging in beiden Fällen auch mit einer Phosphorylierung von Akt (P-Akt) einher. Wie erwartet war im Fall der Hemmung der PI3Ks mit LY294002 in den VEGF-stimulierten Zellen kaum aktiviertes Rac1 nachweisbar. Dies trifft ebenfalls auf die phosphorylierte Form von Akt zu. Bei der Infektion mit GAS A128 und gleichzeitiger Inkubation mit LY294002 war trotz des Fehlens eines Phospho-Akt-Signals aktives Rac1 nachweisbar. Die Menge der aktiven GTPase war in beiden Fällen ungefähr gleich. Darüber hinaus kam es in beiden Fällen auch zu einer Akkumulation von Aktin in der unmittelbaren Umgebung der Streptokokken (Pfeile in Abbildung 4.25).

Diese Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass es sich bei der Rac1-Aktivierung um einen PI3K-unabhängigen Prozess handelt.

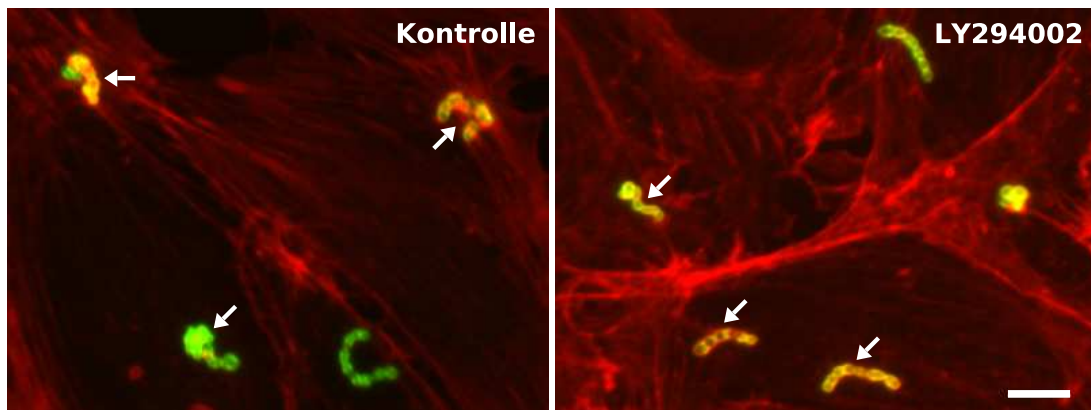


Abbildung 4.25: Akkumulation von Aktin in *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC in der Gegenwart von LY294002. HUVEC wurden für 45 Minuten mit *S. pyogenes* A128 ohne Inhibitor bzw. in der Gegenwart von 25 μ M LY294002 infiziert, fixiert und anschließend gefärbt. Aktinfilamente sind rot und Streptokokken grün dargestellt. Die Pfeile markieren die Akkumulation von Aktin um die Streptokokken. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

4.5.3 *S. pyogenes* A128 kolokalisiert mit dem endosomalen Marker EEA1

Die PI3-Kinasefamilie bildet eine heterogene Gruppe hinsichtlich der Zusammensetzung der Untereinheiten und der Substratspezifität. Das hat zur Folge, dass die PI3Ks bei vielen unterschiedlichen zellulären Vorgängen eine Rolle spielen. Neben der schon erwähnten Funktion bei Veränderungen des Zytoskeletts, bei denen vorrangig Enzyme der Klasse I beteiligt sind, hat hVPS34, eine Kinase der Klasse III, bei Endozytosevorgängen eine wichtige Funktion [92]. Es wurde gezeigt, dass hVPS34 für die Bildung von PtdIns(3)*P* auf der endosomalen Membran verantwortlich ist, was mit der Rekrutierung von EEA1 einhergeht [154, 28]. Diese Rekrutierung findet während der frühen Phasen des endosomalen Reifungsprozesses statt und ist nur transienter Natur.

Um eine mögliche Rolle von PI3-Kinasen der Klasse III bei der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 in HUVEC zu untersuchen, wurden die Zellen mit den Streptokokken für 15 Minuten infiziert. Nach der Fixierung wurden die Streptokokken mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. EEA1 wurde mit monoklonalen Antikörpern und Alexa 568-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt.

Wie Abbildung 4.26 zeigt, war eine starke Akkumulation des endosomalen Markers EEA1 in der Umgebung der in dem eingerahmten Bereich bzw. in der Vergrößerung in der unteren Reihe der Abbildung dargestellten Streptokokkenkette sichtbar. Der Beginn bzw. das Ende dieses Akkumulationsprozesses ist bei den mit der Pfeilspitze markierten Bakterien erkennbar. Die Akkumulation dieses Markers auf der endosomalen Membran ist ein

transienter Prozess, der nur wenige Minuten andauert, was den unterschiedlichen Akkumulationsgrad der in Abbildung 4.26 dargestellten, zellassozierten Streptokokkenketten erklärt.

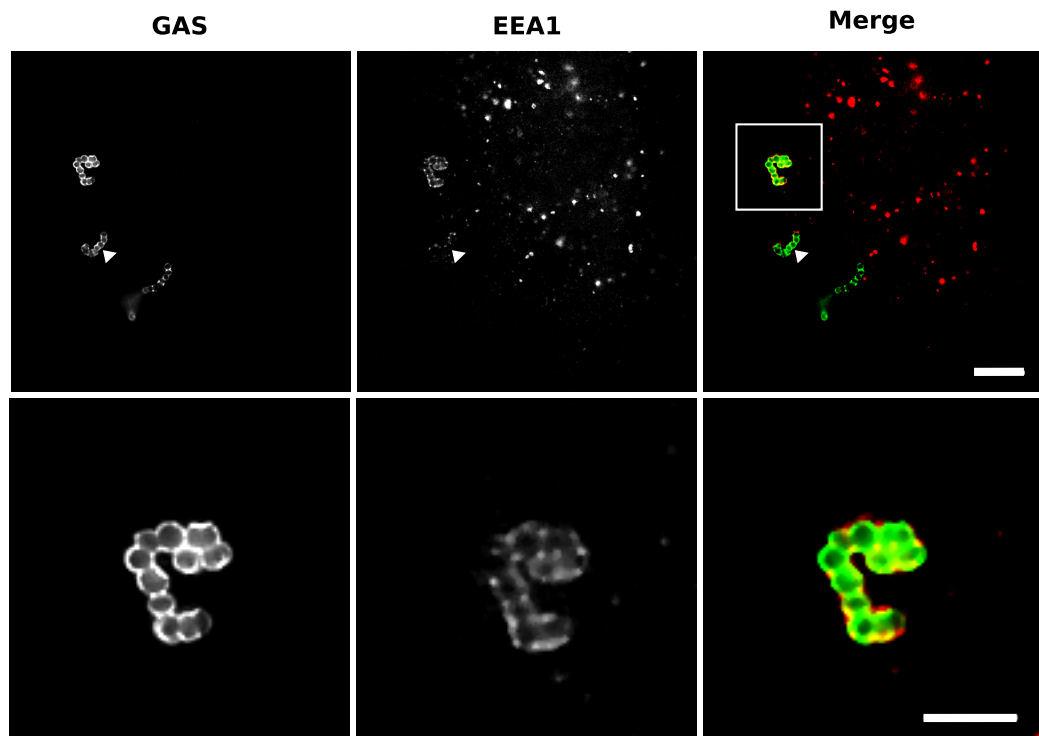


Abbildung 4.26: Lokalisation von *S. pyogenes* A128 und EEA1. HUVEC wurden für 15 Minuten mit *S. pyogenes* A128 (GAS) infiziert und anschließend fixiert. Die Streptokokken wurden mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. EEA1 wurde mit einem monoklonalen Antikörper und Alexa 568-markierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die untere Reihe zeigt eine Vergrößerung des in der Überlagerung der einzelnen Kanäle (Merge) markierten Bereichs. In diesem ist eine starke Akkumulation von EEA1 sichtbar. Die Pfeilspitze markiert eine Streptokokkenkette, bei der die Akkumulation von EEA1 gerade beginnt bzw. sich schon wieder auflöst. Der Maßstab entspricht 10 µm (obere Reihe) bzw. 5 µm (untere Reihe).

Diese Ergebnisse lieferten einen indirekten Beweis für die Beteiligung von Klasse III PI3Ks, da die Generation von PtdIns(3)P auf der endosomalen Membran die Voraussetzung für die Bindung von EEA1 darstellt. Darüber hinaus bestätigten diese Daten die Beobachtung, dass die Internalisierung der M3-Streptokokken auf einem caveolaeunabhängigen Weg erfolgt (vgl. Kapitel 4.2.3).

4.5.4 Modulation des intrazellulären Schicksals von *S. pyogenes* in der Gegenwart von PI3K-Inhibitoren

In Kapitel 4.5.3 konnte die Akkumulation von EEA1 auf der phagosomalen Membran gezeigt werden, die einen indirekten Hinweis auf die Beteiligung von Klasse III PI3Ks lieferte. Dabei handelt es sich um einen transienten Prozess, der von der Inkorporation von spät-endosomalen und lysosomalen Proteinen wie beispielsweise LAMP1 (*lysosomal associated membrane protein 1*) gefolgt wird. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass es bei der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 in humane Endothelzellen zu einer Fusion mit LAMP1-positiven Vesikeln kommt und die Bakterien nach ca. zwei Stunden Infektion die Zelle wieder verlassen können (S. Talay, unveröffentlicht; N. Petermann, Diplomarbeit 2003). Dabei ist auch LAMP1 auf der Zelloberfläche in unmittelbarer Nähe der Bakterien detektierbar (M. Rohde, persönliche Mitteilung).

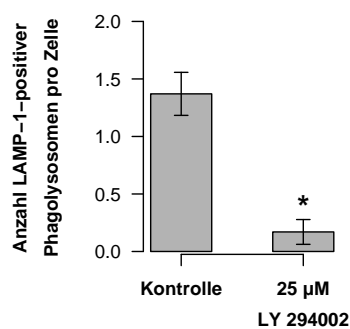


Abbildung 4.27: Quantitative Analyse der PI3K-abhängigen Fusion von *S. pyogenes* A128 mit LAMP1-positiven Lysosomen in HUVEC. Die Daten zeigen die Anzahl an LAMP1-positiven Phagolysosomen pro Zelle (Mittelwert ± Standardabweichung, n=3 Experimente). Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Werten ist mit einem Stern markiert (* $p < 0,005$).

Um die Beteiligung von PI3Ks bei den Vorgängen, die zur Fusion mit den LAMP1-positiven Vesikeln führen zu untersuchen, wurden die Zellen wiederum mit 25 µM LY294002 präinkubiert und anschließend infiziert. Nach 90 Minuten wurden die Zellen fixiert und die Streptokokken mit polyklonalen Anti-GAS Antikörpern und Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. LAMP1 wurde mit monoklonalen Antikörpern und Alexa 568-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt. Die Quantifizierung der phagolysosomalen Fusionen erfolgte wie in Kapitel 3.9.4.3 beschrieben.

Abbildung 4.27 zeigt, dass es, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen, zu einer signifikanten Reduzierung ($p < 0,005$) dieser Fusionsereignisse kam, wenn die Aktivität der PI3Ks gehemmt wurde. Dass die reduzierte Kolo-kalisation in den mit dem PI3K-Inhibitor behandelten Zellen auf der Tatsache beruhte, dass die Aufnahme der Streptokokken in die Zellen nicht mehr stattfand, konnte ausgeschlossen werden, da parallel in jedem Experiment die Anzahl intra- und extrazellulärer Streptokokken bestimmt wurde (vgl. Abbildung 4.23 A). Abbildung 4.28 zeigt exemplarisch den phagolysosomalen Erwerb von

LAMP1 in den Kontrollzellen sowie in den mit LY294002 behandelten Zellen. Die Pfeile markieren Streptokokken, die eine Kolokalisation mit LAMP1 aufweisen. Das Insert zeigt eine Vergrößerung eines solchen Fusionsereignisses in den nicht mit dem Inhibitor behandelten Zellen. Die die Streptokokken umgebende ringförmige Fluoreszenz der LAMP1-Färbung ist deutlich zu erkennen.

Diese Experimente zeigten die Bedeutung der PI3-Kinaseaktivität bei diesen Fusionsvorgängen, die die Voraussetzung für den Erwerb von spät-endosomalen Proteinen darstellt.

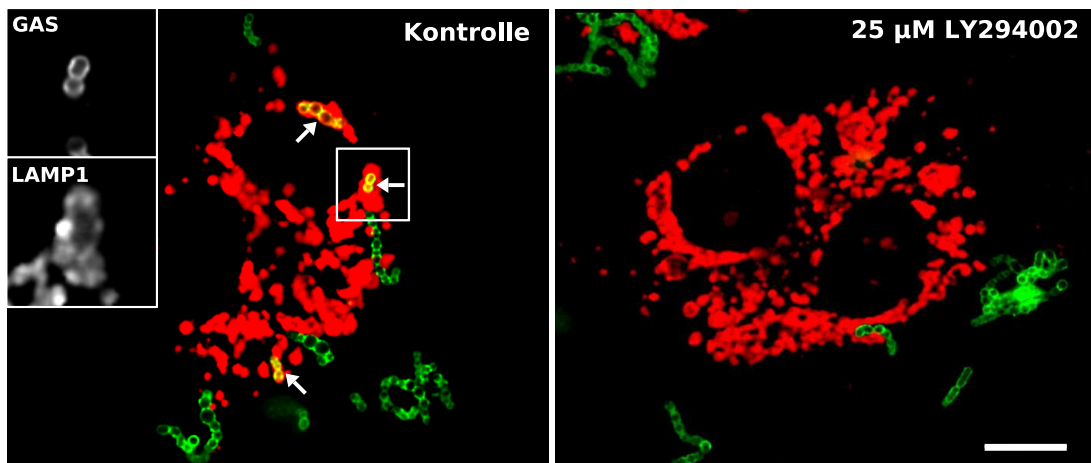


Abbildung 4.28: Phagolysosomaler Erwerb von LAMP1 in Abhängigkeit der PI3K-Aktivität. HUVEC wurden mit 25 µM LY294002 präinkubiert und anschließend für 90 Minuten mit *S. pyogenes* A128 infiziert, fixiert und gefärbt. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Inhibitor behandelt wurden. Die Streptokokken sind in grün und LAMP1 in rot dargestellt. Das Insert zeigt eine Vergrößerung des markierten Bereiches (Kontrolle). Die Pfeile markieren die Kolokalisation von Streptokokken und LAMP1. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, dass nach zwei Stunden mittels eines modifizierten Gentamycin-Assays lebende intrazelluläre Bakterien aus den Zellen isoliert werden konnten. In diesen Versuchen kolokalisierten alle intrazellulären Bakterien mit LAMP1 (Daten nicht gezeigt). Da gezeigt wurde, dass LAMP1 nicht nur über den lysosomalen Weg erworben werden kann [32], wurden ebenfalls Versuche durchgeführt, in denen die intrazellulären Streptokokken nach der Fusion mit Eisendextran beladenen Lysosomen mit Hilfe eines neuen magnetischen Isolations-Assays isoliert wurden. Auch in diesem Fall war es möglich, lebende Bakterien zu isolieren, die sich in diesem Fall in einem Phagolysosom befanden (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

S. pyogenes ist ein wichtiger humanpathogener Erreger, der pro Jahr über 10 Millionen Infektionen verursacht. Obwohl es sich bei diesen Infektionen in der Mehrzahl um lokale Infektionen, das heißt um Infektionen der Haut und des Rachenraumes handelt, treten seit Mitte der 80iger Jahre weltweit immer wieder schwere systemische Streptokokkeninfektionen und Ausbrüche des *streptococcal toxic shock syndrome* (STSS) auf [10, 19, 161]. Diese invasiven Infektionen sind mit hohen Mortalitätsraten von 30-60% verbunden, da es für diese Art der Erkrankung keine wirkungsvolle Therapie gibt [157]. Darüber hinaus werden die Mechanismen, die zum Ausbruch dieser Krankheitsbilder führen, noch immer nicht vollständig verstanden. Zur Entwicklung neuer Therapieansätze ist es zuerst einmal notwendig, die Ereignisse, die zum Ausbruch von invasiven Streptokokkeninfektionen und STSS führen, zu untersuchen und zu verstehen. Ein weiteres Problem bei der Behandlung stellt die Tatsache dar, dass es trotz Antibiotikatherapie mit Penicillin in bis zu 25% der Fälle nicht zu einer vollständigen Beseitigung des Erregers kommt [77, 127]. Eine mögliche Erklärung ist die Spaltung des Antibiotikums durch β -Lactamasen, welche von Kommensalen produziert werden können, die den Wirt zusammen mit den Streptokokken besiedeln. Daneben wird auch die Möglichkeit diskutiert, dass die Invasion in Wirtszellen zum Behandlungsversagen führen könnte, da *S. pyogenes* innerhalb der Zellen vor dem Antibiotikum geschützt ist.

Einer der ersten Schritte in der Pathogenese von Streptokokkeninfektionen stellt die Anheftung an das Haut- und Rachenepithel des Wirtes dar. Von dort können sich die Streptokokken auch in tiefere Gewebeschichten und den Blutkreislauf ausbreiten, wo sie auch mit dem Endothel, das die Blutgefäße auskleidet, in Kontakt kommen. In den letzten Jahren konnten verschiedene, von Streptokokken exprimierte Adhärenzfaktoren isoliert und charakterisiert werden. Darunter sind mehrere Proteine, die über die Bindung von Fibronektin die Adhärenz an die Wirtszellen vermitteln. Insgesamt besitzt *S. pyogenes* mindestens neun verschiedene fibronektinbindende Proteine (zusammengefasst in [162]). Die am besten untersuchten Vertreter sind SfbI/Protein F1, FBP54 und das M1 Protein. Neben den fibronektinbindenden Proteinen besitzen Streptokokken auch drei Kollagenbindungsfaktoren [131, 42]. Darüber hinaus kann auch die Hyaluronsäurekapsel und die Lipoteichonsäure die Bindung an Gewebe des Wirtes vermitteln [144, 150].

Gruppe A Streptokokken wurden lange Zeit als ausschließlich extrazelluläre pathogene Bakterien angesehen. Dass Streptokokken auch in der Lage sind, *in vitro* in nichtphagozytische Wirtszellen einzudringen, wurde erstmals 1994 durch LaPenta *et al.* beschrieben [90]. Mittlerweile sind einige der Invasine, die z. T. identisch mit den schon erwähnten Adhärenzfaktoren sind, und die von ihnen benutzten Signaltransduktionswege genauer charakterisiert worden [36, 124, 133]. Neben den untersuchten Mechanismen der SfbI- und M1 Protein-vermittelten Internalisierung, die noch lange nicht komplett verstanden werden, existieren noch weitere Invasionsstrategien, deren molekulare Grundlagen noch vollständig unerforscht sind.

Das Endothelium besteht aus hochspezialisierten Zellen, die das Innere der Blutgefäße auskleiden. Die Oberfläche dieser Zellpopulation wurde auf $> 1000 \text{ m}^2$ für erwachsene Personen geschätzt [103]. Früher wurde angenommen, dass es sich dabei um einen eher passiven Zelltyp handelt, der lediglich das Blut von dem die Gefäße umgebenden Gewebe trennt. Heute hat sich die Sichtweise durchgesetzt, dass das Endothelium aktiv an Entzündungsprozessen während bakterieller Infektionen beteiligt ist. Verschiedene pathogene Bakterien können auch direkt mit Endothelzellen interagieren und diese invadieren. Beispiele hierfür sind *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis* [171, 113, 49]. Das Endothelium kommt dabei sowohl mit dem Bakterium selbst als auch mit dessen Toxinen in Kontakt. So konnte vor kurzem die Bildung von transienten Makroaperturen in mit *S. aureus* infizierten Endothelzellen durch Boyer und Kollegen gezeigt werden [21]. Als Auslöser konnte EDIN, eine von verschiedenen Staphylokokkenstämmen produzierte ADP-Ribosyltransferase identifiziert werden, die in der Lage ist, die GTPase RhoA zu inaktivieren.

HUVEC – Endothelzellen makrovaskularen Ursprungs – besitzen die charakteristischen Merkmale des *in vivo* Endotheliums und werden in vielen Studien zur Untersuchung von Angiogenese-Mechanismen sowie der Interaktion mit Leukozyten (Transmigration) und Bakterien eingesetzt. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um primäre Zellen, so dass Probleme, die mit dem Immortalisierungsprozess entstehen und insbesondere Signaltransduktionswege beeinflussen, umgangen werden können. Auf der anderen Seite geht die Tatsache, dass es sich bei HUVEC um primäre Zellen handelt bspw. mit komplizierteren Wachstumsbedingungen, begrenzter Lebenszeit und einer gewissen Transformationsresistenz einher.

Ein charakteristisches Merkmal invasiver Streptokokkeninfektionen ist die Isolierung des Erregers aus einem normalerweise sterilen Bereich des Körpers wie zum Beispiel dem Blut im Fall einer Sepsis. Von Medina *et al.* wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem intrazelluläre Streptokokken PMNs als „trojanisches Pferd“ nutzen, um sich in tiefere Ge-

webe und das Blut auszubreiten [102]. Daneben kann aber auch die Möglichkeit, dass freie Bakterien das Endothelium passieren, nicht ausgeschlossen werden. Voraussetzung, um in den Blutkreislauf zu gelangen bzw. diesen möglicherweise wieder zu verlassen, ist eine direkte Interaktion der Bakterien mit den Zellen oder eine indirekte Interaktion über bakterielle Toxine. Denkbar sind sowohl eine parazelluläre als auch eine intrazelluläre Route. Bei diesen Interaktionen scheint es einen Gewebetropismus von unterschiedlichen *S. pyogenes*-Stämmen zu geben. Eine von Bryant und Kollegen veröffentlichte Studie zeigte hinsichtlich der induzierten Produktion von *tissue factor* – einem Protein der Blutgerinnungskaskade – eine M-Typ spezifische Abhängigkeit. Streptokokken des Serotyps M3 erwiesen sich hinsichtlich der Stimulation von *tissue factor* potenter als solche des Serotyps M1. Die Stimulation führte zu einer Verschiebung des normalerweise antikoagulativen Zustandes der Endothelzellen hin zu einem prokoagulativen Zustand [25]. Aufgrund der Tatsache, dass es in der Literatur kaum Daten zu den Interaktionen zwischen Streptokokken und dem Endothelium gibt, ist es notwendig, diese Vorgänge detaillierter zu untersuchen.

Die Internalisierung von SfbI-exprimierenden Streptokokken kann nach Bindung an Fibronectin und dem Clustern von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen auf der Zelloberfläche ausgelöst werden. Vor kurzem konnte durch Rohde *et al.* gezeigt werden, dass dabei spezielle Membranmikrodomänen, sogenannte Caveolae eine Rolle spielen [139]. Bei Streptokokken des Serotyps M3 erfolgt die Internalisierung in Endothelzellen hingegen auf einem fibronectinunabhängigen Weg. Dies konnte durch Experimente mit Agenzien, die die Bindung von Fibronectin an die $\alpha_5\beta_1$ -Integrine hemmen (Anti- β_1 -Integrin-Antikörper, RGD-Peptide, 49mer Peptid), aber keinen Einfluss auf die Internalisierung von M3-Streptokokken haben, gezeigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Internalisierung mit der Bildung von Membranausstülpungen und der Akkumulation von Aktin einhergeht. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zur Rekrutierung des späten endosomalen/lysosomalen Markers LAMP1 zu den die intrazellulären Streptokokken enthaltenden Phagosomen. Nach ca. 1,5 - 2 Stunden sind die Bakterien wieder auf der Zelloberfläche zusammen mit LAMP1 nachweisbar (M. Rohde und S. Talay, unveröffentlicht; N. Petermann, Diplomarbeit 2003).

Die Weiterleitung von Signalen durch die Zellmembran ist essentiell für die Kommunikation der Zellen untereinander sowie mit ihrer Umwelt. Diese Signaltransduktionskaskaden des Wirtes werden jedoch auch von vielen pathogenen Viren und Bakterien genutzt, um nach der Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder Injektion von Effektoren, ihre Aufnahme in Zellen auszulösen. In dieser Arbeit wurde mit mikroskopischen, biochemischen und genetischen Methoden untersucht, welche Signaltransduktionswege in den

Wirtszellen aktiviert werden, wenn Streptokokken des Serotyps M3 in HUVEC internalisiert werden.

Die Tatsachen, dass die intrazellulären Bakterien im Verlauf der Infektion mit LAMP1 kolo-kalisiert und anstelle der für die SfbI-vermittelte Aufnahme typischen Einstülpungen in diesem Fall Membranausstülpungen gebildet wurden, führten zur Hypothese, dass hier möglicherweise andere Membranmikrodomänen (auch *lipid rafts* genannt) als im Fall der SfbI-vermittelten Internalisierung beteiligt sind.

Es hat sich die Sichtweise durchgesetzt, dass *lipid rafts* verschiedene Subtypen bilden, die von den Zellen genutzt werden, um bestimmte Proteine in räumlich begrenzten Membrandomänen zu konzentrieren und dadurch Signaltransduktion-Plattformen zu bilden. Die oben genannten Caveolae bilden dabei einen Subtyp von *lipid rafts*. Die Unterteilung in die unterschiedlichen Membransubdomänen erfolgt dabei aufgrund des Vorhandenseins/Nichtvorhandenseins bestimmter Markerproteine wie z. B. Caveolin 1. Caveolae sind der einzige *lipid raft*-Typ der aufgrund der typischen Einstülpungen auch morphologisch mit elektronenmikroskopischen Methoden nachgewiesen werden kann (vgl. Abbildung 4.7 C).

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, lässt sich die Internalisierung von *S. pyogenes* mit Methyl- β -Cyclodextrin nahezu vollständig hemmen. M β CD depletiert das Cholesterin, einen der Hauptbestandteile von *lipid rafts* aus der Zellmembran. Darüber hinaus konnte eine starke Akkumulation von Cholesterin in der Nähe der bakteriellen Internalisierungsstellen und in den, die Streptokokken umgebenden, vakuolären Membranen beobachtet werden. Ähnliche Cholesterinakkumulationen wurden bei der Invasion von *Shigella flexneri* und *Salmonella typhimurium* beobachtet [84, 56].

Dies traf zwar auch für die Infektion mit SfbI-exprimierenden Streptokokken zu, ein entscheidender Unterschied zeigte sich jedoch hinsichtlich der Akkumulation des Markerproteins Caveolin 1 und der Bildung von Caveolae in der Nähe von invadierenden M3-Streptokokken. Weder die Akkumulation von Caveolin 1 noch die Bildung von Caveolae konnten hier nachgewiesen werden, wodurch die Hypothese eines caveolaeunabhängigen Prozesses bestätigt werden konnte. Viele verschiedene pathogene Bakterien wie zum Beispiel *S. flexneri*, *Mycobacterium* spp. und *Campylobacter jejuni* nutzen Membranmikrodomänen für ihre Internalisierung [84, 57, 182]. Dies eröffnet ihnen mindestens zwei Vorteile: (i) Die Umgehung von intrazellulären, degradativen Prozessen und/oder (ii) die Nutzung von Signaltransduktionswegen, die zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts führen und für die Aufnahme der Bakterien essentiell sind.

Die Bindung der Streptokokken an die Membranmikrodomänen allein ist selbstverständlich nicht ausreichend für die Aufnahme in die Zellen. Vielmehr müssen Kräfte erzeugt

werden, die die Bildung von Membranstrukturen erlauben, die sich über die Bakterien schieben. Von Untersuchungen der Bewegungsvorgänge in Zellen weiß man, dass für die Bildung solcher protrusiver Membranstrukturen die konzertierte Aktivierung von verschiedenen Signalmolekülen nötig ist, die in der gerichteten Polymerisierung von Aktin resultieren. Wichtig für die Signalweiterleitung sind dabei Protein-Tyrosinkinasen, die wie bspw. die Mitglieder der Src-Kinasefamilie in *lipid rafts* lokalisiert sind. Für die Lokalisierung der Src-PTKs in den Membranmikrodomänen sind posttranslationale Modifizierungen in Form von Acetyl- oder Palmitylresten verantwortlich. Abhängig von Art und Anzahl dieser Fettsäurereste ist eine Präferenz für bestimmte *lipid raft*-Subtypen zu beobachten [100].

Um die Rolle von Src-PTKs während der Internalisierung zu untersuchen, wurden Inhibitionstudien mit (i) dem allgemeinen Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein und (ii) dem Src-PTK-spezifischen Inhibitor PP2 durchgeführt. Mit beiden Inhibitoren konnte eine konzentrationsabhängige Inhibierung der Anzahl intrazellulärer Bakterien beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer massiven Tyrosinphosphorylierung von Proteinen in der Umgebung der Streptokokken kommt, die mit der Akkumulation von Aktin einhergeht. Mittels Immunfluoreszenz konnte die Src-Kinase auch direkt in diesen Bereichen nachgewiesen werden. Die Aktivität der Src-Kinase ist dabei für die Bildung der Membranausstülpungen und die Polymerisation von Aktin in der unmittelbaren Umgebung der Streptokokken essentiell. Die Aufnahme der Bakterien ging mit einer Phosphorylierung von Tyr⁴¹⁶ der Kinase einher. Dabei zeigte sich eine starke Übereinstimmung der Aktin-Akkumulationsereignisse (siehe Tabelle 4.1) und der Phosphorylierung über den Verlauf der Infektion. Die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes ist ein Indikator für die Aktivität der Kinase [121] und wurde auch bei der YadA-vermittelten Internalisierung von *Y. pseudotuberculosis* und bei der Fn-vermittelten Invasion von *S. aureus* in Epithelzellen beobachtet [45, 2]. Die essentielle Rolle der Src-Kinase für die Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 in eukaryontische Zellen konnte darüber hinaus durch Infektionsversuche mit Src-defizienten Fibroblasten gezeigt werden, die resistent gegenüber den Streptokokken waren.

Welches Mitglied der Src-PTK-Familie bei der Internalisierung eine Rolle spielt, ist jedoch noch unklar. In Studien mit chimären GFP-Konstrukten konnten McCabe und Berthiaume zeigen, dass die Rekrutierung von verschiedenen Src-PTKs in unterschiedliche *lipid rafts* von der Anzahl und der Natur der Fettsäuremodifizierungen abhängt [100]. Essentiell für die Lokalisation in cholesterin- und sphingolipidreichen aber caveolinnegativen Domänen ist eine zweifache Fettsäuremodifikation. Darüber hinaus spielen aber auch Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle. Aufgrund der Tatsache, dass cholesterinreiche Membranmikrodomänen für die Internalisierung wichtig sind, die Streptokokken wäh-

rend des Aufnahmeprozesses jedoch nicht mit Caveolin 1/Caveolae assoziiert sind, kann über die Beteiligung einer mit mehreren Fettsäuren modifizierten PTK wie beispielsweise Yes spekuliert werden.

Im Fall der SfbI/Protein F1-vermittelten Internalisierung in Epithelzellen wurde ebenfalls eine Abhängigkeit von Src-PTKs beobachtet [124]. In diesem Fall wurde die Bindung an die Zellen über Fibronectin vermittelt, das zur lokalen Rekrutierung von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen unmittelbar unter den gebundenen Bakterien führte. Interessanterweise beobachteten Purushothaman *et al.* keinen Effekt des allgemeinen PTK-Inhibitors Genistein auf die M1 Protein-vermittelte Internalisierung von Streptokokken, die ebenfalls über Fibronectin und $\alpha_5\beta_1$ -Integrine abläuft [133]. Die Gründe für diese unterschiedlichen Mechanismen liegen vermutlich darin begründet, dass unterschiedliche Co-Rezeptoren im Fall der beiden Fn-vermittelten Wege beteiligt sind. Tatsächlich konnte durch Rezcallah *et al.* gezeigt werden, dass für die effiziente Aufnahme eines M1-exprimierenden Stammes die Bindung an den Co-Rezeptor CD46 notwendig ist [134]. Es kann also spekuliert werden, dass bei der SfbI/Protein F1-abhängigen Internalisierung andere Co-Rezeptoren beteiligt sind, was letztendlich in der Aktivierung von anderen Signaltransduktionswegen resultiert. Unabhängig davon konnte aber für beide Internalisierungswege eine Akkumulation von Aktin während der Aufnahme der Bakterien beobachtet werden. Welche Faktoren dabei für die Polymerisation des Aktins verantwortlich waren, wurde nicht untersucht.

Src-PTKs können auch unabhängig von Integrinen durch andere Rezeptoren aktiviert werden (zusammengefasst in [23]). Während der Invasion von *Shigella* spp. werden hingegen über die Injektion von Effektoren durch Typ-III-Sekretionssysteme massive Veränderungen des Zytoskeletts ausgelöst, die zur Internalisierung der Bakterien führen. Diese Aktivierung führt im Zusammenspiel mit den GTPasen Cdc42 und Rac1 zur Phosphorylierung von Cortactin, einem zytoskelettalen Protein, das die Aktinpolymerisation vermitteln kann [20].

Die Mitglieder der Rho GTPase-Familie spielen – wie auch die Src-PTK-Familie – eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Erhaltung der Zellmorphologie, der Polarität, bei der Zellmigration und -teilung. Beide Signalwege können sich gegenseitig beeinflussen oder auch parallel wirken. Hinsichtlich ihrer Funktionsweise unterscheiden sich die Rho GTPasen aber grundlegend von Src-PTKs. Die GTPasen fungieren als molekulare Schalter innerhalb der Signalwege, die zu einer Aktivierung der Aktinpolymerisation führen, weshalb sie eine Schlüsselrolle einnehmen. Aufgrund ihrer Schalterfunktion können sie ankommende Signale in eine koordinierte Folge von Antwortsignalen umwandeln, welche zu ortsspezifischen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts führen [48]. Insbesondere Rac1 wurde mit der Bildung protrusiver Membranausstülpungen in Verbindung gebracht

[112]. Es ist somit nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl von pathogenen Bakterien Mechanismen entwickelt hat, durch Aktivierung der GTPasen und den damit einhergehenden zytoskelettalen Veränderungen, ihre Aufnahme in Wirtszellen auszulösen.

Um die Rolle der kleinen GTPase Rac1 hinsichtlich der während der Internalisierung von *S. pyogenes* A128 gebildeten Membranprotrusionen und Aktinfilamente zu untersuchen, wurden HUVEC mit Wildtyp-Rac1 und der dominant negativen Form von Rac1 transfiziert. Beide Konstrukte waren mit GFP fusioniert, was die einfache Identifizierung von transfizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop erlaubte. Obwohl die verwendeten HUVEC, wie alle primären Zellen eine gewisse Transformationsresistenz aufwiesen, war es durch Verwendung der Nukleofektionsmethode jedoch möglich, hohe Transfektionsraten zu erzielen. Diese lagen, abhängig vom zu transfizierenden Konstrukt, bei ca. 60-80%. Zusätzlich ermöglichte es die Analyse am Fluoreszenzmikroskop, nur die Zellen zu untersuchen, die auch transfiziert waren. Es konnte gezeigt werden, dass es zur Akkumulation von Rac1 und einer damit einhergehenden Polymerisation von Aktin in der unmittelbaren Umgebung der Bakterien kommt. Die Aktivität von Rac1 ist dabei für die Aufnahme der Streptokokken essentiell, wie die 85%ige Inhibierung in den mit der dominant negativen Form von Rac1 transfizierten Zellen zeigt. Diese Aktivierung konnte biochemisch durch Präzipitation des aktiven Rac1 aus den infizierten Zellen weiter verifiziert werden. Die auf den ersten Blick geringe Menge an GTP-gebundenem Rac1 muss allerdings vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass es nur zu einer Aktivierung in der unmittelbaren Umgebung der Bakterien kommt. Diese Aktivierung erfolgt transient innerhalb eines kurzen Zeitfensters, was die Verwendung des Synchronisationsprotokolls unumgänglich macht (siehe Kapitel 4.1.3). Vergleicht man den Verlauf des Auftretens der Aktin-Akkumulationsereignisse mit der Kinetik der Rac1-Aktivierung, so zeigt sich ein ähnlicher zeitlicher Verlauf.

Rac1 ist jedoch nicht in der Lage, die Aktinpolymerisation direkt zu initiieren, sondern aktiviert Mitglieder der WASP-Familie, die wiederum zu einer Aktivierung des Arp2/3-Komplexes führen [160]. Arp2/3 ist einer der Hauptpolymerisationsfaktoren und verantwortlich für die Bildung von verzweigten Aktinfilamenten [16, 6]. Durch Kollokalisationsexperimente konnte in dieser Arbeit das erste Mal eine Beteiligung des Arp2/3-Komplexes bei der Bildung von Aktinfilamenten während der Internalisierung von *S. pyogenes* gezeigt werden. Inwieweit Cortactin, eines der Hauptsubstrate von Src-PTKs, das darüber hinaus auch direkt mit dem Arp2/3-Komplex interagieren und diesen aktivieren kann [132, 176], eine Rolle bei der Bildung der Aktin-Akkumulationen spielt, ist momentan unklar. Aufgrund der Tatsache, dass die Internalisierung in Zellen, die mit der dominant negativen Form von Rac1 transfiziert wurden, praktisch nicht mehr stattfand, deutet auf eine essentielle Rolle der GTPase bei der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes hin. Es kann aber

nicht ausgeschlossen werden, dass beide Faktoren – Src und Rac1 – synergistisch oder auch parallel wirkend für die optimale Aktivierung notwendig sind. Um diese Frage zu klären, sind noch weitere Versuche notwendig.

Eines ähnlichen Mechanismus bedienen sich enteropathogene *Yersinia* spp., die durch die Bindung von Invasin an β_1 -Integrine eine Rac1-Aktivierung auslösen. Diese Aktivierung resultiert in einer durch den Arp2/3-Komplex initialisierten Aktinpolymerisation um die Bakterien und ist essentiell für deren Aufnahme [5]. Im Fall der durch *S. pyogenes* A128 induzierten Aktinakkumulation kommt es – im Vergleich zu der *Yersinia* Invasin-abhängigen Aufnahme – jedoch nicht zu einer Aktivierung von Integrinen, da der Aufnahmeprozess unabhängig von β_1 -Integrinen abläuft.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Zellen mit Wachstumsfaktoren zur Bildung von Membranprotrusionen führt. Diese Vorgänge waren strikt Rac-abhängig [136]. Die Bindung der Wachstumsfaktoren führt dabei zur Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, an die über SH2-Domänen weitere Proteine binden können. Die Rekrutierung des heterodimeren Enzyms PI3-Kinase, welches über SH2-Domänen verfügt, war dabei für die Aktivierung von Rac1 als Antwort auf die Stimulierung mit Wachstumsfaktoren entscheidend. Die exakte Funktion der PI3K im Kontext der Rac1-Aktivierung ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Insbesondere ist im Moment noch unklar, ob PI3K für die Aktivierung von Rac1 oder Rac1 für die Aktivierung von PI3K verantwortlich ist.

Purushothaman *et al.* konnten zeigen, dass die Internalisierung eines M1-exprimierenden Streptokokkenstammes PI3K-abhängig ist [133]. Inhibitionsstudien mit SfbI-exprimierenden *S. gordonii*-Stämmen zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit der Internalisierung von der PI3K-Aktivität (A. Nerlich, unveröffentlicht). Die Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 in HUVEC wurde dagegen von dem PI3K-Inhibitor LY294002 nicht beeinflusst. Die Rolle der PI3Ks, insbesondere im Hinblick auf die Aktivierung von Rac1 wurde deshalb genauer untersucht.

In Inhibitionsversuchen mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Für den SfbI-exprimierenden Stamm A40 wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien in der Gegenwart des Inhibitors um 60% reduziert, während der Stamm des Serotyps M3 keine Veränderung hinsichtlich der Anzahl intrazellulärer Bakterien aufwies. Eine ähnliche PI3K-Abhängigkeit konnte für die Invasion von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*, *Helicobacter pylori* und M1-exprimierende Streptokokken gezeigt werden, bei deren Aufnahme β_1 -Integrine beteiligt sind [45, 146, 81, 133]. Hier zeigte sich ein entscheidender Unterschied zwischen der Internalisierung von Streptokokken des Sero-

typs M3, die nicht PI3K-abhängig ist, und pathogenen Bakterien, deren Aufnahme über einen β_1 -Integrin-abhängigen Prozess abläuft.

Hinsichtlich der Akkumulation von Aktin in der unmittelbaren Umgebung der Streptokokken während des Internalisierungsprozesses konnte ebenfalls kein Unterschied beobachtet werden. Die Rac1-Aktivierung erfolgt hier offensichtlich auf einem PI3K-unabhängigen Weg (siehe Abbildung 4.24). Trotz Hemmung durch LY294002 ist GTP-gebundenes Rac1 in den mit *S. pyogenes* A128-infizierten HUVEC nachweisbar. Lambert und Kollegen konnten in Fibroblasten einen PI3K-unabhängigen Mechanismus für die Aktivierung von Rac1 nachweisen [85]. Die Vermittlung des Aktivierungssignals erfolgt hierbei über Tiam1 und die GTPase Ras unter Umgehung des PI3K-Signalweges. In VEGF-stimulierten Zellen, für die eine Abhängigkeit der Rac1-Aktivierung von der PI3K nachgewiesen wurde [186] und als Kontrolle für einen PI3K-abhängigen Weg der Aktivierung dienen, ist hingegen wie erwartet keine Aktivierung in der Gegenwart des Inhibitors nachweisbar. In beiden Fällen ist in den LY294002-behandelten Zellen die phosphorylierte Form von Akt nicht nachweisbar, was für eine vollständige Hemmung der Klasse I PI3Ks spricht.

Welche Rolle die Phosphorylierung von Akt und die dieser Phosphorylierung vorausgehende Aktivierung von Klasse I PI3Ks bei der Infektion mit GAS A128 spielt, ist noch völlig unklar. Marshall *et al.* berichteten von einer Beteiligung dieser PI3K-Subfamilie bei der adsorptiven Phagozytose [99]. Die Akkumulation von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, dem Produkt von Klasse I PI3Ks, wurde dabei nur während der Phase, in der das Phagosom geschlossen wurde, beobachtet. Diese Prozesse gehen mit der Akkumulation von Aktin einher. Unmittelbar danach fiel der $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ -Spiegel wieder auf das Ausgangsniveau. Trotz Hemmung der PI3K durch Wortmannin kam es noch zur Akkumulation von Aktin, während die Konzentration von $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ nach Zugabe des Inhibitors stark abnahm. Die Rolle von Klasse I PI3Ks für die Akkumulation von Aktin in den sog. *phagosomal cups* wird jedoch kontrovers diskutiert. Während die Akkumulation von Klasse I PI3Ks an der Plasmamembran ausreichend für die Initiierung der Aktinpolymerisation und die Phagozytose ist [94], wird die Aufnahme von größeren Partikeln durch Wortmannin gehemmt, obwohl es noch zur Akkumulation von Aktin kommt [34]. Bei der Internalisierung von M3-Streptokokken in HUVEC, bei denen es sich nicht um phagozytische Zellen im klassischen Sinne handelt, ist die Aufnahme nicht beeinträchtigt. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die exakte Rolle von Klasse I PI3Ks in diesem Prozess zu klären.

Die Familie der PI3Ks setzt sich, wie schon angedeutet aus verschiedenen Klassen zusammen, die aufgrund der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und der Substratspezifität in unterschiedlichen biologischen Prozessen eine Rolle spielen [92]. Neben der schon angesprochen Funktion bei Umlagerungen des Zytoskeletts spielen PI3Ks jedoch auch bei

Endozytosevorgängen eine Rolle. Sowohl Klasse I als auch Klasse III PI3Ks werden durch den Inhibitor LY294002 wirkungsvoll gehemmt.

hVPS34, das bisher einzige identifizierte Mitglied der Klasse III, bindet an die endosomale GTPase Rab5 und ist für die weitere Reifung von frühen Endosomen essentiell [28]. Durch Bildung von PtdIns(3)*P* auf der endosomalen Membran kommt es zur Rekrutierung von EEA1, einem Effektorprotein mit einer FYVE-Domäne. Zusätzlich zur Bindung an PtdIns(3)*P* kann EEA1 auch an die GTPase Rab5 binden und auf diese Weise die homotypische Fusion von endosomalen Vesikeln vermitteln. Die Rekrutierung von EEA1 zu den M3-GAS-enthaltenden Phagosomen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden und stellt einen indirekten Hinweis auf die Aktivität von Klasse III PI3Ks dar. Diese Befunde stehen in scheinbarem Widerspruch zu einer von Håkansson *et al.* veröffentlichten Arbeit zur Interaktion von M3-Streptokokken mit humanen Keratinozyten, bei denen keine Kolo-kalisation mit EEA1 und Rab5 nachgewiesen werden konnte [60]. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass (i) die Ergebnisse nicht ohne weiteres zwischen den beiden Zelltypen übertragen werden können und (ii) die Generation von PtdIns(3)*P* und die damit einhergehende Rekrutierung von EEA1 und Rab5 ein transients Prozess ist, der in ca. 3-5 Minuten vollständig abgeschlossen ist [172, 145]. Diese Tatsache kann dazu führen, dass dieser Prozess in fixierten Zellen möglicherweise übersehen wird. Die beste Möglichkeit solche transients Prozesse während der Infektion mit Bakterien darzustellen, ist die Videomikroskopie in Verbindung mit GFP-markierten Proteinen (siehe [145]).

Die Aktivierung von hVPS34 ist nicht nur wichtig für die Rekrutierung von EEA1 sondern ist auch die Voraussetzung für den Erwerb von spät-endosomalen/lysosomalen Markern wie LAMP1 [172, 53]. Es konnte in den mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 behandelten Zellen eine Reduzierung der Fusion zwischen den GAS A128-enthaltenden Phagosomen und LAMP1-positiven Vesikeln nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Klasse III PI3K in diesen Prozessen involviert sind. In Infektionsversuchen mit *N. gonorrhoeae* konnte ebenfalls eine nicht mehr stattfindende Fusion mit den Lysosomen beobachtet werden [17].

Streptokokken des Serotyps M3 sind in dem auch in dieser Arbeit verwendeten System in der Lage, die Zellen nach 1.5-2 Stunden wieder zu verlassen. Sie sind dabei zusammen mit LAMP1 außerhalb der Zellen auf der Oberfläche nachweisbar. Inwieweit die lysosomale Fusion eine Voraussetzung darstellt, damit die Bakterien die Zellen wieder verlassen können, ist momentan noch ungeklärt. Die Tatsache, dass die Aufnahme der Streptokokken mit der Akkumulation von Aktin und der Rekrutierung von frühen endosomalen Markerproteinen und im weiteren Verlauf mit Markern für späte Endosomen/Lysosomen einhergeht, deutet auf einen klassischen endosomalen Weg der Internalisierung hin. Ob es im weiteren Verlauf zu einer vollständigen Reifung der Phagosomen kommt und/oder

es sich dabei um einen Mechanismus handelt, der es den Streptokokken ermöglicht, sich ausgehend vom Blutkreislauf nach Überwindung der Endothelbarriere in tieferliegende Gewebeschichten auszubreiten, muss noch weiter untersucht werden.

Es sei an dieser Stelle aber darauf hingewiesen, dass es möglich ist, nach zwei Stunden lebende, intrazelluläre Streptokokken aus den Zellen zu isolieren. In verschiedenen Studien wurde außerdem gezeigt, dass *S. pyogenes* in der Lage ist, in Makrophagen [167] und PMNs [155], d. h. in professionellen, phagozytischen Zellen für eine gewisse Zeit zu überleben. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unerforscht. Das Überleben in PMNs wurde auf die Expression von M und M-ähnlichen Proteinen zurückgeführt [155]. Ein ähnlicher phagosomaler Reifungsprozess wie der in dieser Arbeit beschriebene konnte vor kurzem für *S. aureus*, ebenfalls ein Gram-positives, pathogenes Bakterium, in HUVEC nachgewiesen werden [145]. Während die Mehrzahl der untersuchten *S. aureus*-Stämme relativ schnell abgetötet wurden, waren bestimmte Varianten in der Lage längere Zeit in den Endothelzellen zu überleben. Die Überlebensrate dieser *small colony variants* verbesserte sich sogar nach mehrmaliger Zellpassage.

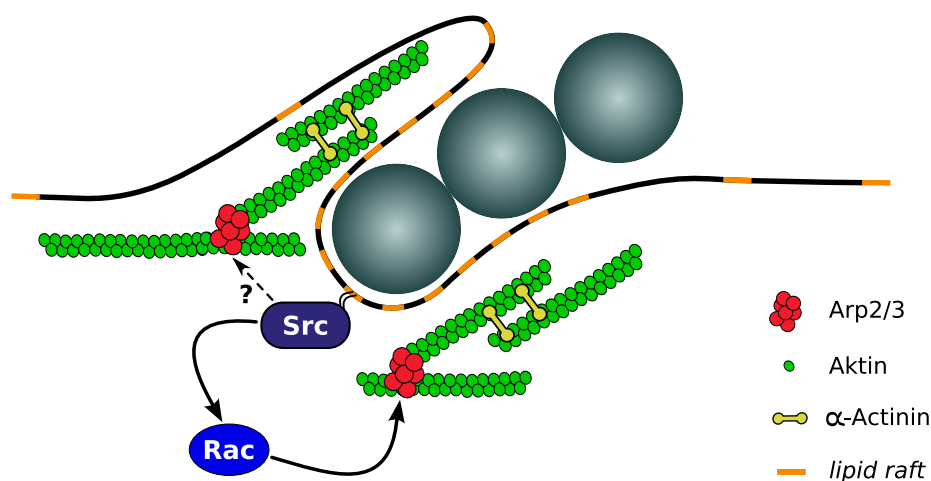


Abbildung 5.1: Modell der Signaltransduktionsvorgänge während der Internalisierung von *S. pyogenes* A128. Die Aufnahme von Streptokokken des Serotyps M3 erfolgt durch Aktivierung von Protein-Tyrosinkinasen der Src-Familie und der GTPase Rac1 nach Bindung der Streptokokken an *lipid rafts*. In Folge dessen kommt es zur Rekrutierung von Arp2/3 und zur Polymerisation von Aktin. Die gebildeten Aktinfilamente werden durch α -Actinin stabilisiert.

In dieser Arbeit wurden die an der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3 beteiligten Signaltransduktionswege auf molekularer Ebene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die auf der ultrastrukturellen Ebene sichtbaren protrusiven Membranaus-

stülpungen nicht nur mit der Polymerisation von Aktin sondern auch mit der Rekrutierung des die Aktinfilamente stabilisierenden Proteins α -Actinin einhergeht. Wichtig für die Initiierung der Signalkaskaden ist die Bindung an *lipid rafts*, die sich in der Zellmembran befinden und wichtige Signaltransduktionsplattformen darstellen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die in diesen Membranmikrodomänen lokalisierten Src-Kinasen für die Aufnahme essentiell sind. Neben der Aktivität dieser Proteinkinasen ist die kleine GTPase Rac1 wichtig für die Akkumulation von Aktin in der unmittelbaren Umgebung der Bakterien und für die Bildung der damit einhergehenden Membranausstülpungen. Die Polymerisation von Aktin selbst wird offensichtlich durch den Arp2/3-Komplex initiiert. Inwieweit die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes auch durch die Src-Kinase erfolgt, ist noch ungeklärt. Die Aktivierung von Rac1 erfolgt dabei unabhängig von Klasse I PI3-Kinasen. Diese Vorgänge sind in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt.

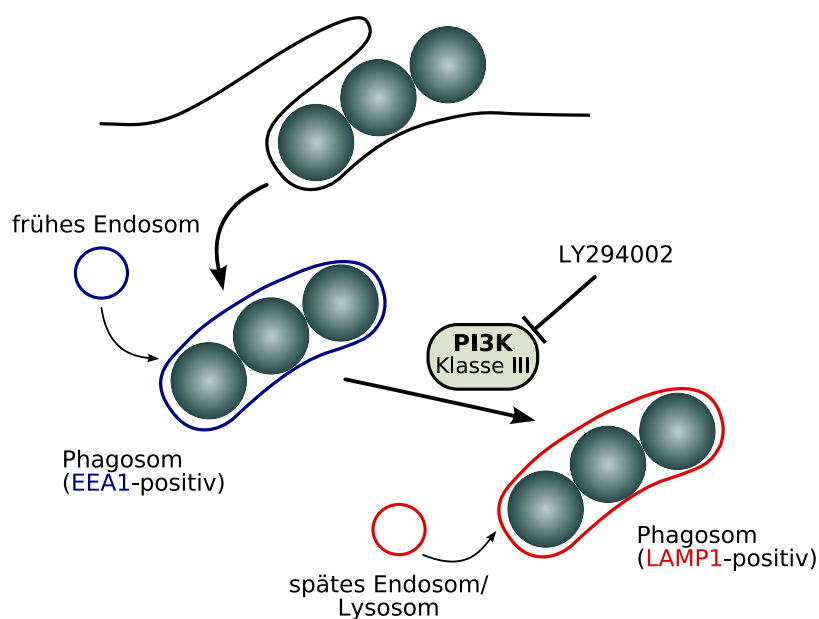


Abbildung 5.2: Endosomale Fusionsereignisse während der Internalisierung von Streptokokken des Serotyps M3. Eine wichtige Rolle für das intrazelluläre Schicksal der Streptokokken spielen PI3-Kinasen der Klasse III (hVPS34). Unmittelbar nach der Aufnahme kolokalisieren die Streptokokken mit EEA1, einem Marker für frühe Endosomen. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zur Fusion mit LAMP1-positiven späten Endosomen/Lysosomen. Dieser Prozess kann durch den PI3K-Inhibitor LY294002 gehemmt werden.

Eine Beteiligung von PI3Ks konnte jedoch hinsichtlich der Fusionsereignisse der GAS-enthaltenden Phagosomen gezeigt werden. Die Streptokokken gelangen nach der Aufnahme in Phagosomen, die EEA1, einen Marker für frühe Endosomen, besitzen. Im wei-

teren Verlauf der Infektion kommt es in Folge von weiteren Fusionsereignissen mit späten Endosomen/Lysomen zum Erwerb von LAMP1. Dieser Vorgang ist PI3K-abhängig, wie durch Inhibitionsversuche mit LY294002 gezeigt werden konnte. Dabei handelt es sich vermutlich um die mit Endozytosevorgängen in Verbindung gebrachte Klasse III der PI3K-Familie. Die eben beschriebenen Vorgänge sind schematisch in dem Modell in Abbildung 5.2 dargestellt.

Mit dieser Arbeit wurden somit erstmals die Grundlagen für weitere Untersuchungen dieses bislang einzigartigen Internalisierungsprozesses gelegt. Dessen weiterführende Analyse, insbesondere des intrazellulären Schicksals dieses Serotyps, könnte von essentieller Bedeutung für das Verständnis der molekularen Abläufe im Fall von invasiven Streptokokkeninfektionen sein.

6 Literaturverzeichnis

- [1] L. Abrami and F.G. van der Goot. Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J. Cell. Biol.*, 147:175–184, 1999.
- [2] F. Agerer, A. Michel, K. Ohlsen, and C.R. Hauck. Integrin-mediated invasion of *Staphylococcus aureus* into human cells requires Src family protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 278:42524–31, 2003.
- [3] P. Åkesson, J. Cooney, F. Kishimoto, and L. Björck. Protein H—a novel IgG binding bacterial protein. *Mol. Immunol.*, 27:523–531, 1990.
- [4] P. Åkesson, A.G. Sjöholm, and L. Björck. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. *J. Biol. Chem.*, 271:1081–1088, 1996.
- [5] M.A. Alrutz, A. Srivastava, K.-W. Wong, C. D’Souza-Schorey, M. Tang, L.-E. Ch’ng, S.B. Snapper, and R.R. Isberg. Efficient uptake of *Yersinia pseudotuberculosis* via integrin receptors involves a Rac1-Arp 2/3 pathway that bypasses N-WASP function. *Mol. Microbiol.*, 42:689–703, 2001.
- [6] K.J. Amann and T.D. Pollard. The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.*, 3:306–310, 2001.
- [7] M. Ammendolia, L. Bertuccini, F. Minelli, S. Meschini, and L. Baldassarri. A *Sphingomonas* bacterium interacting with epithelial cells. *Res. Microbiol.*, 155:636–646, 2004.
- [8] K.E. Anderson, J. Coadwell, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr. Biol.*, 8:684–691, 1998.
- [9] C.D. Ashbaugh, H.B. Warren, V.J. Carey, and M.R. Wessels. Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. *J. Clin. Invest.*, 102:550–560, 1998.

- [10] E.M. Ayoub. Resurgence of rheumatic fever in the United States. The changing picture of a preventable illness. *Postgrad. Med.*, 29:133–142, 1992.
- [11] E.H. Beachey. Bacterial adherence: adhesin-receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Inf. Dis.*, 134:325–345, 1981.
- [12] A. Berge and L. Björck. Streptococcal cysteine proteinase releases biologically active fragments of streptococcal surface proteins. *J. Biol. Chem.*, 270:9862–9867, 1995.
- [13] C. Berkower, M. Ravins, A.E. Moses, and E. Hanski. Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence to and invasion of eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.*, 31:1463–1475, 1999.
- [14] A. Bernard. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1603:47–82, 2003.
- [15] D. Bessen and V.A. Fischetti. Influence of intranasal immunization with synthetic peptides corresponding to conserved epitopes of M protein on mucosal colonization by group A streptococci. *Infect. Immun.*, 56:2666–2672, 1988.
- [16] L. Blanchoin, K.J. Amann, H.N. Higgs, J.B. Marchand, D.A. Kaiser, and T.D. Pollard. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*, 404:1007–1011, 2000.
- [17] J.W. Booth, D. Telio, E.H. Liao, S.E. McCaw, T. Matsuo, S. Grinstein, and S.D. Gray-Owen. Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biol. Chem.*, 278:14037–14045, 2003.
- [18] R.J. Botelho, D.J. Hackam, A.D. Schreiber, and S. Grinstein. Role of COPI in phagosome maturation. *J. Biol. Chem.*, 275:15717–15727, 2000.
- [19] M. Bott. Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria. *Arch. Microbiol.*, 167:78–88, 1997.
- [20] L. Bougnères, S.E. Girardin, S.A. Weed, A.V. Karginov, J.C. Olivo-Marin, J.T. Parsons, Sansonetti P.J., and G.T. Van Nhieu. Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *J. Cell. Biol.*, 166:225–235, 2004.
- [21] L. Boyer, A. Doye, M. Rolando, G. Flatau, P. Munro, P. Gounon, R. Clement, C. Pulcini, M.R. Popoff, A. Mettouchi, L. Landraud, O. Dussurget, and E. Lemichez. In-

- pduction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by
- Staphylococcus aureus*
- factors.
- J. Cell Biol.*
- , 173:809–819, 2006.
- [22] D.A. Brown, , and E. London. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14:111–136, 1998.
- [23] M.T. Brown and J.A. Cooper. Regulation, substrates and functions of Src. *Biochim. Biophys. Acta*, 1287:121–149, 1996.
- [24] S.D. Brown and M.J. Rybak. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001-2002, as part of the PROTEKT US study. *J. Antimicrob. Chemother.*, 54: Suppl 1:i7–15, 2004.
- [25] A.E. Bryant, S.M. Hayes-Schroer, and D.L. Stevens. M type 1 and 3 group A streptococci stimulate tissue factor-mediated procoagulant activity in human monocytes and endothelial cells. *Infect. Immun.*, 71:1903–1910, 2003.
- [26] X.R. Bustelo. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol. Cell. Biol.*, 20:1461–1477, 2000.
- [27] G.S. Chhatwal. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol.*, 10:205–208, 2002.
- [28] S. Christoforidis, M. Miaczynska, K. Ashman, M. Wilm, L. Zhao, S.-C. Yip, M.D. Waterfield, J.M. Backer, and M. Zerial. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat. Cell. Biol.* 1, 249-252., 1:249–252, 1999.
- [29] P.P. Cleary, Y.V. Matsuka, T. Huynh, H. Lam, and S.B. Olmsted. Immunization with C5a peptidase from either group A or B streptococci enhances clearance of group A streptococci from intranasally infected mice. *Vaccine*, 22:4332–4341, 2004.
- [30] M. Collin and A. Olsen. Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. *Infect. Immun.*, 69:7187–7189, 2001.
- [31] L.A. Cone, D.R. Woodard, P.M. Schlievert, and G.S. Tomory. Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. *N. Engl. J. Med.*, 317:146–149, 1987.
- [32] N.R. Cook, P.E. Row, and H.W. Davidson. Lysosome associated membrane protein 1 (LAMP1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic*, 5:685–699, 2004.

- [33] H.S. Courtney, J.B. Dale, and D.I. Hasty. Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEp-2 tissue culture cells. *Infect Immun.*, 64:2415–2419, 1996.
- [34] D. Cox, C.C. Tseng, G. Bjekic, and S. Greenberg. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.*, 274:1240–1247, 1999.
- [35] G.E. Cozier, J. Carlton, D. Bouyoucef, and P.J. Cullen. Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 282:49–88, 2004.
- [36] D. Cue, P.E. Dombek, H. Lam, and P.P. Cleary. *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect. Immun.*, 66:4593–4601, 1998.
- [37] D. Cue, S.O. Southern, P.J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J.M. Smallheer, S.A. Mousa, and P.P. Cleary. A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin $\alpha_5\beta_1$ -fibronectin-M1 protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97:2858–2863, 2000.
- [38] M.W. Cunningham. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13:470–511, 2000.
- [39] C. Cywes and M.R. Wessels. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature*, 414:648–652, 2001.
- [40] J.B. Dale. Multivalent group A streptococcal vaccine designed to optimize the immunogenicity of six tandem M protein fragments. *Vaccine*, 17:193–200, 1999.
- [41] J.B. Dale, R.G. Washburn, M.B. Marques, and M.R. Wessels. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 64:1495–1501, 1996.
- [42] K. Dinkla, M. Rohde, W.T. Jansen, E. Kaplan, G.S. Chhatwal, and S.R. Talay. Rheumatic fever-associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. *J. Clin. Invest.*, 111:1905–1912, 2003.
- [43] P.E. Dombek, D. Cue, J. Sedgewick, H. Lam, S. Ruschkowski, B.B. Finlay, and P.P. Cleary. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol. Microbiol.*, 31:859–870, 1999.
- [44] A. Efstratiou. Group A streptococci in the 1990s. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45: Suppl:3–12, 2000.

- [45] J. Eitel, T. Heise, U. Thiesen, and P. Dersch. Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of *Yersinia pseudotuberculosis* require common signalling molecules (FAK, c-Src, Ras) and distinct cell factors. *Cell. Microbiol.*, 7:63–77, 2005.
- [46] S. Elliot. A proteolytic enzyme produced by group A streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen. *J. Exp. Med.*, 81:573–592, 1945.
- [47] C.D. Ellson, S. Andrews, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. The PX domain: a new phosphoinositide-binding module. *J. Cell Sci.*, 115:1099–1105, 2002.
- [48] S. Etienne-Manneville and A. Hall. Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420:629–635, 2002.
- [49] E. Eugène, I. Hoffmann, C. Pujol, P.-O. Couraud, S. Bourdoulous, and X. Nassif. Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 115:1231–1241, 2002.
- [50] L.A. Feig. Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.*, 1:E25–E27, 1999.
- [51] B.A. Fernie-King, D.J. Seilly, A. Davies, and P.J. Lachmann. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect. Immun.*, 70:4908–4916, 2002.
- [52] M.J. Foley and W.B. Jr. Wood. Studies on the pathogenicity of group A streptococci. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel. *J. Exp. Med.*, 110:617–628, 1959.
- [53] R.A. Fratti, J.M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera, and V. Deretic. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.*, 154:631–644, 2001.
- [54] I.M. Frick, P. Akesson, M. Rasmussen, A. Schmidtchen, and L. Björck. SIC, a secreted protein of *Streptococcus pyogenes* that inactivates antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.*, 278:16561–16566, 2003.
- [55] E.K. Fridriksson, P.A. Shipkova, E.D. Sheets, D. Holowka, B. Baird, and F.W. McLafferty. Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry*, 38:8056–8063, 1999.

- [56] M.J. Garner, R.D. Hayward, and V. Koronakis. The *Salmonella* pathogenicity island 1 secretion system directs cellular cholesterol redistribution during mammalian cell entry and intracellular trafficking. *Cell. Microbiol.*, 4:153–165, 2002.
- [57] J. Gatfield and J. Pieters. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, 288:1647–1650, 2000.
- [58] N.O. Gekara and S. Weiss. Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O. *Biochem. Soc. Trans.*, 32:712–714., 2004.
- [59] E. Giannakis, T.S. Jokiranta, R.J. Ormsby, T.G. Duthy, D.A. Male, D. Christiansen, V.A. Fischetti, C. Bagley, B.E. Loveland, and D.L. Gordon. Identification of the streptococcal M protein binding site on membrane cofactor protein (CD46). *J. Immunol.*, 168:4585–4592, 2002.
- [60] A. Hakansson, C.C. Bentley, E.A. Shakhnovic, and M.R. Wessels. Cytolysin-dependent evasion of lysosomal killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102:5192–5197, 2005.
- [61] K. Haldar, N. Mohandas, B.U. Samuel, T. Harrison, N.L. Hiller, T. Akompong, and Cheres P. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cell. Microbiol.*, 4:383–395, 2002.
- [62] A. Hall. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279:509–514, 1998.
- [63] E. Hanski and M. Caparon. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 6172–6176, 1992.
- [64] T. Harder and K. Simons. Caveolae, DIGs, and the dynamics of shingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:534–542., 1997.
- [65] H. Herwald, M. Collin, W. Müller-Esterl, and L. Björck. Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. *J. Exp. Med.*, 184:665–673, 1996.
- [66] M. Herzog, A. Draeger, E. Ehler, and J.V. Small. Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton. in *Cell Biology Laboratory Handbook*. Academic Press, San Diego, 1994.
- [67] N.M. Hooper. Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae. *Mol. Membr. Biol.*, 16:145–156, 1999.

- [68] D.L. Horn, J.B. Zabriskie, R. Austrian, P.P. Cleary, J.J. Ferretti, V.A. Fischetti, E. Gottschlich, E.L. Kaplan, M. McCarty, S.M. Opal, R.B. Roberts, A. Tomasz, and Y. Wachtfogel. Why have group A streptococci remained susceptible to penicillin? Report on a symposium. *Clin. Infect. Dis.*, 26:1341–1345, 1998.
- [69] R.D. Horstmann, H.J. Sievertsen, J. Knobloch, and V.A. Fischetti. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:1657–1661, 1988.
- [70] J. Huang and G.W. Feigenson. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys. J.*, 76:2142–2157, 1999.
- [71] T.T. Huang, H. Malke, and J.J. Ferretti. Heterogeneity of the streptokinase gene in group A streptococci. *Infect. Immun.*, 57:502–506, 1989.
- [72] L.K. Husmann, D.L. Yung, S.K. Hollingshead, and J.R. Scott. Role of putative virulence factors of *Streptococcus pyogenes* in mouse models of long-term throat colonization and pneumonia. *Infect. Immun.*, 65:1422–1430, 1997.
- [73] K. Jacobson and C. Dietrich. Looking at lipid rafts? *Trends Cell Biol.*, 9:87–91, 1999.
- [74] J. Jadoun, V. Ozeri, E. Burstein, E. Skutelsky, E. Hanski, and S. Sela. Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis.*, 178:147–58, 1998.
- [75] J. Jaffe, S. Natanson-Yaron, M.G. Caparon, and E. Hanski. Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Mol. Microbiol.*, 21:373–384, 1996.
- [76] A.T. Jones and M.J. Clague. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for early endosome fusion. *Biochem. J.*, 311:31–34, 1995.
- [77] E.L. Kaplan and D.R. Johnson. Eradication of group A streptococci from the upper respiratory tract by amoxicillin with clavulanate after oral penicillin V treatment failure. *J. Pediatr.*, 113:400–403, 1988.
- [78] R.A. Klinghoffer, C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.*, 18:2459–2471, 1999.
- [79] A. Kobiela, H.A. Pasolli, and E. Fuchs. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.*, 6:21–30, 2004.

- [80] T.V. Kurzchalia and R.G. Parton. Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:424–431, 1999.
- [81] T. Kwok, S. Backert, H. Schwarz, J. Berger, and T.F. Meyer. Specific entry of *Helicobacter pylori* into cultured gastric epithelial cells via a zipper-like mechanism. *Infect. Immun.*, 70:2108–2120, 2002.
- [82] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [83] F. Lafont and F.G. van der Goot. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell. Microbiol.*, 7: 613–620, 2005.
- [84] F. Lafont, G. Tran Van Nhieu, K. Hanada, P. Sansonetti, and F.G. van der Goot. Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *EMBO J.*, 21:4449–4457, 2002.
- [85] J.M. Lambert, Q.T. Lambert, G.W. Reuther, A. Malliri, D.P. Siderovski, J. Sondek, J.G. Collard, and C.J. Der. Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat. Cell Biol.*, 4:621–625, 2002.
- [86] R.C. Lancefield. The Antigenic Complex of *Streptococcus haemolyticus*. *J. Exp. Med.*, 47:91–103, 1928.
- [87] R.C. Lancefield. Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test. *J. Exp. Med.*, 106:525–544, 1957.
- [88] P. Lang, F. Gesbert, M. Delespine-Carmagnat, R. Stancou, M. Pouchelet, and J. Bertoglio. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.*, 15:510–519, 1996.
- [89] G. Langanger, J. de Mey, M. Moeremans, G. Daneels, M. de Brabander, and J. V. Small. Ultrastructural localization of α -actinin and filamin in cultured cells with the immunogold staining (IGS) method. *J. Cell Biol.*, 99:1324–1334, 1984.
- [90] D. LaPenta, C. Rubens, E. Chi, and P.P. Cleary. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 91:12115–12119, 1994.
- [91] M.A. Lemmon and K.M. Ferguson. Signal-dependent membrane targeting by plekstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.*, 350:1–18, 2000.

- [92] K. Lindmo and H. Stenmark. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J. Cell Sci.*, 119:605–614, 2006.
- [93] R. Lottenberg, D. Minning-Wenz, and M.D. Boyle. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol.*, 2:20–24, 1994.
- [94] M.B. Lowry, A.M. Duchemin, K.M. Coggeshall, J.M. Robinson, and C.L. Anderson. Chimeric receptors composed of phosphoinositide 3-kinase domains and FC γ receptor ligand-binding domains mediate phagocytosis in COS fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 273:24513–24520, 1998.
- [95] L.M. Machesky, S.J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and T.D. Pollard. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.*, 127:107–115, 1994.
- [96] M.H. Macris, N. Hartman, B. Murray, R.F. Klein, R.B. Roberts, E.L. Kaplan, D. Horn, and J.B. Zabriskie. Studies of the continuing susceptibility of group a streptococcal strains to penicillin during eight decades. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 17:377–381, 1998.
- [97] S. Manes, G. del Real, and A.C. Martinez. Pathogens: raft hijackers. *Trends Immunol.*, 3:557–568, 2003.
- [98] G. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298:1912–1934., 2002.
- [99] J.G. Marshall, J.W. Booth, V. Stambolic, T. Mak, T. Balla, A.D. Schreiber, T. Meyer, and S. Grinstein. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc γ receptor-mediated phagocytosis. *J. Cell Biol.*, 153:1369–1380, 2001.
- [100] J.B. McCabe and L.G. Berthiaume. N-terminal protein acylation confers localization to cholesterol, sphingolipid-enriched membranes but not to lipid rafts/caveolae. *Mol. Biol. Cell.*, 12:3601–3617, 2001.
- [101] J.K. McCormick and P.M. Schlievert. Toxins and superantigens of Group A streptococci. in: *Gram-Positive Pathogens*. ASM Press, Washington D.C., 1 edition, 2000.
- [102] E. Medina, M. Rohde, and G.S. Chhatwal. Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect. Immun.*, 71:5376–5380, 2003.
- [103] M.M. Müller and A. Griesmacher. Markers of endothelial dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38:77–85, 2000.

- [104] G. Molinari, S.R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G.S. Chhatwal. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.*, 65:1357–1363, 1997.
- [105] G. Molinari, M. Rohde, C.A. Guzman, and G.S. Chhatwal. Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell. Microbiol.*, 2: 145–154, 2000.
- [106] J. Müthing, S. Duvar, D. Heitmann, F.-G. Hanisch, U. Neumann, G. Lochnit, R. Geyer, and J. Peter-Katalinic. Isolation and structural characterization of glycosphingolipids of *in vivo* propagated human umbilical vein endothelial cells. *Glycobiol.*, 9: 459–468, 1999.
- [107] S. Mukherjee and F.R. Maxfield. Membrane domains. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20: 839–866, 2004.
- [108] C.P. Müller, D. A. Stephany, D.F. Winkler, J. M. Hoeg, S. J. Jr. Demosky, and J. R. Wunderlich. Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. *Cytometry*, 5:42–54, 1984.
- [109] J.T. Murray, C. Panaretou, H. Stenmark, M. Miaczynska, and J.M. Backer. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic*, 3:416–427, 2002.
- [110] J.M. Musser, A.R. Hauser, M.H. Kim, P.M. Schlievert, K Nelson, and R.K. Selander. *Streptococcus pyogenes* causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88:2668–2672, 1991.
- [111] E.B. Neufeld, A.M. Cooney, J. Pitha, E.A. Dawidowicz, N.K. Dwyer, P.G. Pentchev, and E.J. Blanchette-Mackie. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J. Biol. Chem.*, 271(35):21604–13, 1996.
- [112] C.D. Nobes, P. Hawkins, L. Stephens, and A. Hall. Activation of the small GTP-binding proteins Rho and Rac by growth factor receptors. *J. Cell Sci.*, 108:225–233, 1995.
- [113] S.K. Ogawa, E.R. Yurberg, V.B. Hatcher, M.A. Levitt, and F.D. Lowy. Bacterial adherence to human endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.*, 50:218–224, 1985.

- [114] P. Oh and J.E. Schnitzer. Immunoisolation of caveolae with high affinity antibody binding to the oligomeric cage. *J. Biol. Chem.*, 274:23144–23154, 1999.
- [115] M. Okada and H. Nakagawa. A protein tyrosine kinase involved in regulation of pp60c-src function. *J. Biol. Chem.*, 264:20886–20893, 1989.
- [116] N. Okada, M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, and Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92:2489–2493, 1995.
- [117] I.M. Olazabal, E. Caron, R.C. May, K. Schilling, D.A. Knecht, and L.M. Machesky. Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not Fc γ R, phagocytosis. *Curr. Biol.*, 12:1413–1418, 2002.
- [118] C. Olivier. Rheumatic fever—is it still a problem? *J. Antimicrob. Chemother.*, 45: Suppl:13–21, 2000.
- [119] B. Olofsson. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal*, 11:545–554, 1999.
- [120] M.F. Olson, A. Ashworth, and A. Hall. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, 269:1270–1272, 1995.
- [121] D.W. Owens, G.W. McLean, A.W. Wyke, C. Paraskeva, E. K. Parkinson, M.C. Frame, and V.G. Brunton. The catalytic activity of the Src family kinases is required to disrupt cadherin-dependent cell-cell contacts. *Mol. Biol. Cell*, 11:51–64, 2000.
- [122] V. Ozeri, A. Tovi, I. Burstein, S. Natanson-Yaron, M.G. Caparon, K.M. Yamada, S.K. Akiyama, I. Vlodavsky, and E. Hanski. A two-domain mechanism for group A streptococcal adherence through protein F to the extracellular matrix. *EMBO J.*, 15:989–98, 1996.
- [123] V. Ozeri, I. Rosenshine, D.F. Mosher, R Fässler, and E. Hanski. Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol. Microbiol.*, 30:625–637, 1998.
- [124] V. Ozeri, I. Rosenshine, A. Ben-Ze’Ev, G.M. Bokoch, T. S. Jou, and E. Hanski. *De novo* formation of focal complex-like structures in host cells by invading streptococci. *Mol. Microbiol.*, 41:561–573, 2001.
- [125] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.*, 4:2411–2423, 1995.

- [126] L. Pelkmans and A. Helenius. Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:414–422, 2003.
- [127] M.E. Pichichero. The rising incidence of penicillin treatment failures in group A streptococcal tonsillopharyngitis: an emerging role for the cephalosporins? *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 10:S50–S55, 1991.
- [128] J. Pitha, T. Irie, P.B. Sklar, and J.S. Nye. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Science*, 43:493–502, 1988.
- [129] J. Pizarro-Cerda and P. Cossart. Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat. Cell Biol.*, 6:1026–1033, 2004.
- [130] A. Podbielski and B. Kreikemeyer. Persistence of group A streptococci in eukaryotic cells—a safe place? *Lancet*, 358:3–4, 2001.
- [131] A. Podbielski, M. Woischnik, B.A. Leonard, and K.H. Schmidt. Characterization of *nra*, a global negative regulator gene in group A streptococci. *Mol. Microbiol.*, 31:1051–1064, 1999.
- [132] T.D. Pollard. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature*, 422:741–745, 2003.
- [133] S.S. Purushothaman, B. Wang, and P.P. Cleary. M1 protein triggers a phosphoinositide cascade for group A *Streptococcus* invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.*, 71:5823–5830, 2003.
- [134] M.S. Rezcallah, K. Hodges, D.B. Gill, J.P. Atkinson, B. Wang, and P.P. Cleary. Engagement of CD46 and $\alpha_5\beta_1$ integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 7:645–653, 2005.
- [135] A.J. Ridley and A. Hall. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70:389–99, 1992.
- [136] A.J. Ridley, H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70:401–10, 1992.
- [137] C.L. Rocha and Fischetti V.A. Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 67:2720–2728, 1999.

- [138] P. Rodriguez-Vician, P.H. Warne, A. Khwaja, B.M. Marte, D. Pappin, P. Das, M.D. Waterfield, A. Ridley, and J. Downward. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, 89:457–467, 1997.
- [139] M. Rohde, E. Müller, G.S. Chhatwal, and S.R. Talay. Host cell caveolae act as an entry-port for group A streptococci. *Cell. Microbiol.*, 5:323–342, 2003.
- [140] K. Rottner, T.E. Stradal, and J. Wehland. Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev. Cell*, 9:3–17, 2005.
- [141] E.E. Sander, S. van Delft, J.P. ten Klooster, T. Reid, R.A. van der Kammen, F. Michiels, and J.G. Collard. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Cell Biol.*, 143:1385–1398., 1998.
- [142] A. Schmidt and A. Hall. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.*, 16:1587–1609, 2002.
- [143] A. Schmidtchen, I.M. Frick, E. Andersson, H. Tapper, and L. Björck. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.*, 46:157–168, 2002.
- [144] H.M. Schragar, S. Alberti, C. Cywes, G.J. Dougherty, and M.R. Wessels. Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A streptococcus to CD44 on human keratinocytes. *J. Clin. Invest.*, 101:1708–1716, 1998.
- [145] A. Schröder, R. Kland, A. Peschel, C. von Eiff, and M. Aepfelbacher. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berlin)*, pages 1–10, 2006.
- [146] R. Schulte, R. Zumbühl, D. Kampik, A. Fauconnier, and I.B. Autenrieth. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 187:53–60, 1998.
- [147] U. Schwarz-Linek, J.M. Werner, A.R. Pickford, S. Gurusiddappa, J.H. Kim, E.S. Pilka, J.A. Briggs, T.S. Gough, M. Höök, I.D. Campbell, and J.R. Potts. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem β -zipper. *Nature*, 423:177–181, 2003.

- [148] S. Sela and A. Barzilai. Why do we fail with penicillin in the treatment of group A streptococcus infections? *Ann. Med.*, 31:303–307, 1999.
- [149] S. Sela, A. Aviv, A. Tovi, I. Burstein, M.G. Caparon, and E. Hanski. Protein F: an adhesin of *Streptococcus pyogenes* binds fibronectin via two distinct domains. *Mol. Microbiol.*, 10:1049–1055, 1993.
- [150] S. Sela, M.J. Marouni, R. Perry, and A. Barzilai. Effect of lipoteichoic acid on the uptake of *Streptococcus pyogenes* by HEp-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, 193:187–193, 2000.
- [151] S. Seveau, H. Bierne, S. Giroux, M. Prevost, and P. Cossart. Role of lipid rafts in E-cadherin- and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J. Cell Biol.*, 166:743–753, 2004.
- [152] A. Shet, E.L. Kaplan, D.R. Johnson, and Cleary P.P. Immune response to group A streptococcal C5a peptidase in children: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.*, 188:809–817, 2003.
- [153] G. Sierig, C. Cywes, M.R. Wessels, and C.D. Ashbaugh. Cytotoxic effects of streptolysin O and streptolysin S enhance the virulence of poorly encapsulated group A streptococci. *Infect. Immun.*, 71:446–455, 2003.
- [154] A. Simonsen, R. Lippé, S. Christoforidis, J.-M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B.-H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, 394:494–498, 1998.
- [155] L. Staali, M. Mörgelin, L. Björck, and Tapper H. *Streptococcus pyogenes* expressing M and M-like surface proteins are phagocytosed but survive inside human neutrophils. *Cell. Microbiol.*, 5:253–265, 2003.
- [156] H. Stenmark, R. Aasland, and P.C. Driscoll. The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett.*, 513:77–84, 2002.
- [157] D.L. Stevens. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg. Infect. Dis.*, 1:69–78, 1995.
- [158] G.H. Stollerman. Rheumatic fever. *Lancet*, 349:935–942, 1997.
- [159] A.C. Stoolmiller and A. Dorfman. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus pyogenes*. *J. Biol. Chem.*, 244:236–246, 1969.

- [160] T.E. Stradal, K. Rottner, A. Disanza, S. Confalonieri, M. Innocenti, and G. Scita. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol.*, 14: 303–311, 2004.
- [161] A. Stromberg, V. Romanus, and L.G. Burman. Outbreak of group A streptococcal bacteremia in Sweden: an epidemiologic and clinical study. *J. Infect. Dis.*, 164:595–598, 1991.
- [162] S.R. Talay. Gram-positive adhesins. in: *Contributions to Microbiology*. Karger, 2005.
- [163] S.R. Talay, P. Valentin-Weigand, P.G. Jerlstrom, K.N. Timmis, and G.S. Chhatwal. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect. Immun.*, 60: 3837–3844, 1992.
- [164] S.R. Talay, P. Valentin-Weigand, K.N. Timmis, and G.S. Chhatwal. Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein, the fibronectin-binding adhesin of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.*, 13:531–539, 1994.
- [165] S.R. Talay, A. Zock, M. Rohde, M. Molinari, G. and Oggioni, G. Pozzi, C.A. Guzman, and G.S. Chhatwal. Co-operative binding of human fibronectin to SfbI protein triggers streptococcal invasion into respiratory epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 2:521–535, 2000.
- [166] S.M. Thomas and J.S. Brugge. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:513–609, 1997.
- [167] P. Thulin, L. Johansson, D.E. Low, B.S. Gan, M. Kotb, A. McGeer, and A. Norrby-Teglund. Viable group A streptococci in macrophages during acute soft tissue infection. *PLoS Med.*, 3:e53, 2006.
- [168] R.W. Tilghman and R.L. Hoover. E-selectin and ICAM-1 are incorporated into detergent-insoluble membrane domains following clustering in endothelial cells. *FEBS Lett.*, 525:83–87, 2002.
- [169] B. Vanhaesebroeck, S.J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P.C. Driscoll, R. Woscholski, P.J. Parker, and M.D. Waterfield. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:535–602, 2001.
- [170] R. Varma and S. Mayor. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*, 394:798–801, 1998.

- [171] G.M. Vercellotti, D. Lussenhop, P.K. Peterson, L.T. Furcht, J.B. McCarthy, H.S. Jacob, and C.F. Moldow. Bacterial adherence to fibronectin and endothelial cells: a possible mechanism for bacterial tissue tropism. *J. Lab. Clin. Med.*, 103:34–43, 1984.
- [172] O.V. Vieira, R.J. Botelho, L. Rameh, S.M. Brachmann, T. Matsuo, H.W. Davidson, A. Schreiber, J.M. Backer, L.C. Cantley, and S. Grinstein. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J. Cell Biol.*, 155:19–25, 2001.
- [173] C.J. Vlahos, W.F. Matter, K.Y. Hui, and R.F. Brown. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.*, 269:5241–5248, 1994.
- [174] B. Wang, R.S. Yurecko, S. Dedhar, and P.P. Cleary. Integrin-linked kinase is an essential link between integrins and uptake of bacterial pathogens by epithelial cells. *Cell. Microbiol.*, 8:257–266, 2006.
- [175] H.R. Wang, Y. Zhang, B. Ozdamar, A.A. Ogunjimi, E. Alexandrova, G.H. Thomsen, and J.L. Wrana. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, 302:1775–1779, 2003.
- [176] A.M. Weaver, J.E. Heuser, A.V. Karginov, W.L. Lee, J.T. Parsons, and J.A. Cooper. Interaction of cortactin and N-WASP with Arp2/3 complex. *Curr. Biol.*, 12:1270–1278, 2002.
- [177] H.C. Welch, W.J. Coadwell, L.R. Stephens, and P.T. Hawkins. Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett.*, 546:93–97, 2003.
- [178] S. Wennstrom, A. Siegbahn, K. Yokote, A.K. Arvidsson, C.H. Heldin, S. Mori, and L. Claesson-Welsh. Membrane ruffling and chemotaxis transduced by the PDGF beta-receptor require the binding site for phosphatidylinositol 3' kinase. *Oncogene*, 9:651–660, 1994.
- [179] M.R. Wessels, A.E. Moses, J.B. Goldberg, and T.J. DiCesare. Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:8317–8321, 1991.
- [180] M.R. Wessels, J.B. Goldberg, A.E. Moses, and T.J. DiCesare. Effects on virulence of mutations in a locus essential for hyaluronic acid capsule expression in group A streptococci. *Infect. Immun.*, 62:433–441, 1994.

- [181] A.A. Wolf, M.G. Jobling, S. Wimer-Mackin, M. Ferguson-Maltzman, J.L. Madara, R.K. Holmes, and W.I. Lencer. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J. Cell Biol.*, 141:917–927, 1998.
- [182] K.G. Wooldridge, P.H. Williams, and J.M. Ketley. Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathog.*, 21:299–305, 1996.
- [183] R. Woscholski, T. Kodaki, M. McKinnon, M.D. Waterfield, and P.J. Parker. A comparison of demethoxyviridin and wortmannin as inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett.*, 342:109–114, 1994.
- [184] R. Young, D. Holowka, and B. Baird. A lipid raft environment enhances Lyn kinase activity by protecting the active site tyrosine from dephosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 278:20746–20752, 2003.
- [185] R. Young, X. Zheng, D. Holowka, and B. Baird. Reconstitution of regulated phosphorylation of FcεR I by a lipid raft-excluded protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 280:1230–1235, 2004.
- [186] H. Zeng, D. Zhao, and D. Mukhopadhyay. Flt-1-mediated down-regulation of endothelial cell proliferation through pertussis toxin-sensitive G proteins, beta gamma subunits, small GTPase CDC42, and partly by Rac-1. *J. Biol. Chem.*, 277:4003–4009, 2002.
- [187] X.M. Zheng, R.J. Resnick, and D. Shalloway. A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPa. *EMBO J.*, 19:964–978, 2000.
- [188] S. Zrihan-Licht, J. Lim, I. Keydar, M.X. Sliwkowski, J.E. Groopman, and H. Avraham. Association of Csk-homologous kinase (CHK) (formerly MATK) with HER-2/ErbB-2 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 272:1856–1863, 1997.

7 Abkürzungsverzeichnis

mA	Milliamper
Alexa 488	Alexa Fluor® 488
Alexa 568	Alexa Fluor® 568
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BD	BD Bioscience
BSA	Bovine serum albumin
°C	Grad Celsius
CCD	<i>charge coupled device</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CRIB	Cdc42-Rac1 interaktive Bindungsdomäne
CS	Cell Signalling
DAG	Diacylglycerol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRMs	detergentienresistente Membranen
DTT	Dithiothreitol
ε	molarer Extinktionskoeffizient
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EEA1	<i>early endosomal antigen 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	Endothelial Groth Medium

7 Abkürzungsverzeichnis

FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBP54	<i>fibronectin-binding protein 54</i>
FBS	fötales Rinderserum
FCS	fötales Kälberserum
FC γ R	Immunglobulin G Rezeptor
FESEM	Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop
FYVE-Domäne	in <u>F</u> ab1, <u>Y</u> OTB, <u>V</u> ac1 und <u>EE</u> A1 konservierte Domäne
g	Erdbeschleunigung
GAPs	GTPase-aktivierende Proteine
GAS	Gruppe A Streptokokken
GDP	Guanosindiphosphat
GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziierungsinhibitoren
GEFs	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GPI-APs	Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GST	Glutathion-S-Transferase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N \checkmark -2-ethansulfonsäure
HMVEC	<i>human microvascular vein endothelial cells</i>
HRG	<i>histidine-rich glycoprotein</i>
HRP	Meerettichperoxidase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitorkonzentration
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
ILK	<i>integrin linked kinase</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
K ⁻	Negativkontrolle
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria Bertani

7 Abkürzungsverzeichnis

LY	LY294002
µm, nm	Mikrometer, Nanometer
M	molar
MβCD	Methyl-β-Cyclodextrin
min	Minute
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
N17Rac1	dominant negative Form von Rac1
NA	numerische Apertur
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
<i>p</i>	<i>p</i> -Wert
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAK1	p21-aktivierte Kinase
PBS	phosphatgepufferte Saline
PDK1	Phosphatidylinositol-abhängige Kinase 1
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologiedomäne
PI3K oder PI3-Kinase	Phosphoinositid 3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PMNs	Polymorphkernige Leukozyten
PMT	<i>photo multiplier tube</i>
PtdIns	Phosphatidylinositole
PtdIns(4,5) <i>P</i> ₂	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PtdIns(3,4,5) <i>P</i> ₃	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat
PTK	Protein-Tyrosinkinase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
Ser	Serin
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

7 Abkürzungsverzeichnis

SfBI	<i>streptococcal fibronectin-binding protein I</i>
SH	Src-homologe Domäne
SIC	<i>streptococcal inhibitor of complement</i>
SLO	Streptolysin O
SLS	Streptolysin S
Spe	<i>streptococcal pyrogenic exotoxin</i>
STSS	<i>streptococcal toxic shock syndrome</i>
SYF-Zellen	Src-, Yes-, Fyn-negative Zellen
SYF + c-Src-Zellen	c-Src-rexprimierende SYF-Zellen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
THB	Todd Hewitt Broth
Thr	Threonin
THY	Todd Hewitt Yeast
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSB	Tryptic Soy Broth
Tyr	Tyrosin
U	Unit (1 U : Umsatz von 1 Mol Substrat/min)
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	vaskulärer Endothelwachstumsfaktor
w/v	Gewicht/Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
wtRac1	Wildtyp-Rac1
ZSP	zytoskelettstabilisierender Puffer

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. S. Chhatwal für die Bereitstellung des Themas und und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Mikrobielle Pathogenität und Impfstoffforschung anfertigen zu können sowie die Übernahme des Referats.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. D. Jahn der sich zur Übernahme des zweiten Referats bereit erklärt hat.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. M. Rohde und Dr. S. Talay für die praktische Betreuung dieser Arbeit, die hilfreichen Anregungen und Diskussionen, die wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben. Dr. M. Rohde und Ina Schleicher danke ich außerdem für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die praktische Einführung in die Geheimnisse der Elektronenmikroskopie, die es mir ermöglichten, einige Proben teilweise selbst zu präparieren.

Darüber hinaus geht mein Dank an Prof. Dr. I. Just und Dr. H. Genth für die Bereitstellung des GST-CRIB-Konstruktes, die Einführung in die Welt der GTPasen sowie ihre Diskussionsbereitschaft und die freundliche Aufnahme im Labor des Instituts für Toxikologie der MMH.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Prof. Dr. C. R. Hauck bedanken, der die SYF- und SYF + c-Src-Zellen zur Verfügung stellte.

Dr. I. Sastalla danke ich für die Überlassung der wtRac- und N17Rac-exprimierenden *E. coli* Stämme.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei allen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Pathogenität für das angenehme Arbeitsklima und für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag vor allem Katja Mummenbrauer und Andreas Itzek für die gute Zusammenarbeit im Labor D1.37 sowie bei Gesa Heuser, Nina Janze und Dr. Oliver Goldmann.

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und dieser Arbeit und natürlich auch bei Lena für ihre unendliche Geduld und Unterstützung bedanken.